



Artur Jorge Ribeiro Gonçalves

Licenciatura em Ciências de Engenharia Biomédica

DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO UTILIZANDO TECNOLOGIA LAB-ON-PAPER

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Orientadora: Elvira Maria Correia Fortunato, Prof. Doutora, FCT-UNL

Júri:

Presidente: Prof. Doutora Carla Maria Quintão Pereira

Arguente: Prof. Doutor José Ricardo Ramos Franco Tavares

Vogal: Prof. Doutora Elvira Maria Correia Fortunato



FACULDADE DE
CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

Março, 2015

DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO UTILIZANDO TECNOLOGIA LAB-ON-PAPER

Orientadora: Prof. Doutora Elvira Fortunato

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Biomédica

Departamento de Física
Faculdade de Ciências e Tecnologia
Universidade Nova de Lisboa

Março de 2015

DESENVOLVIMENTO DE TESTES DE DIAGNÓSTICO UTILIZANDO TECNOLOGIA LAB-ON-PAPER

Copyright © 2015 – Todos os direitos reservados. Artur Jorge Ribeiro Gonçalves. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa.

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objectivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

*“Acima de tudo, adquiere sabedoria e conhecimento,
ainda que te custem tudo o que possuis”*

Provérbios 4,7

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus pelo dom da vida e por estar a terminar mais uma etapa do meu percurso.

Agradeço à minha orientadora, Professora Elvira Fortunato por me ter sugerido este tema para a minha tese e por ter podido desenvolver este trabalho no CENIMAT.

Os meus agradecimentos estendem-se também à Mafalda Costa que desde o início deste trabalho me acompanhou, se mostrou disponível para me ajudar, para discutir pontos de vista, opinando e dando-me sugestões. Agradeço-lhe igualmente toda a paciência que demonstrou para me fazer entender as coisas.

À Equipa da Professora Doutora Maria da Ascensão Reis, do Departamento de Química da FCT, por me terem facultado o polímero (Poli-3-hidroxibutirato) necessário à realização das minhas experiências e pelos estudos relacionado com filmes de P(3HB) expostos à radiação UV e ozono, o meu sincero obrigado.

À Alexandra Gonçalves e à Ana Pimentel que sempre se mostraram disponíveis para realizar as análises de DSC que precisei. À Sónia Pereira e à Joana Pinto pela disponibilidade demonstrada nas análises de DRX e à Daniela Salgueiro pelas análises de SEM.

Ao Paulo Duarte pelas sugestões e opiniões sobre questões práticas relacionadas com o trabalho.

Um obrigado muito especial também a todos os amigos que fiz no CENIMAT que também me apoiaram neste trabalho.

Aos meus amigos do curso de Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica da FCT.

Finalmente, mas não menos importante, aos meus pais e irmãos que apesar da distância sempre estiveram presentes na minha vida ao longo destes 5 anos aconselhando-me, apoiando-me e dando-me força para continuar.

Resumo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) refere que a diabetes é uma das doenças mais comum no mundo. Segundo esta organização, existem no mundo mais de 300 milhões de pessoas afectadas. É provável que este número duplique nas próximas décadas se não forem tomadas medidas. Por essa razão a OMS tem desenvolvido esforços no sentido de incentivar as empresas, as universidades e os investigadores a criarem técnicas de diagnóstico e monitorização que apresentem características como: baixo custo, simples e rápida execução e portabilidade para responder aos interesses globais de saúde, particularmente nos países economicamente desfavorecidos.

Neste trabalho desenvolveram-se dispositivos microfluídicos a partir da conjugação do substrato de papel Whatman nº1 e biopolímero poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)] que apresentam as características indicadas pela OMS e têm a vantagem de serem biodegradáveis.

O método de fabricação destes dispositivos baseia-se na impregnação do papel com poli-3-hidroxibutirato tornando-o hidrófobo. Sobrepondo a esse papel máscaras de fita adesiva de Kapton, com padrões impressos, e submetendo-os à exposição da radiação ultravioleta e ozono (UV-O₃) criam-se canais e zonas de testes hidrófilas delimitadas por barreiras hidrófobas de P(3HB).

Os dispositivos desenvolvidos foram aplicados à detecção e quantificação de glucose em soluções aquosas com recurso a ensaios colorimétricos. Através da reacção entre o analito e os indicadores de oxidação/redução e uma solução de enzimas imobilizados nas zonas de testes, ocorre uma alteração de cor, proporcional à concentração inicial da glucose.

Os resultados dos dispositivos foram visualmente analisados, digitalizados e posteriormente processados com o *software* de imagem *ImageJ*.

Abstract

The World Health Organization (WHO) makes reference of diabetes as one of the most common diseases in the world. According to this organization it exists in the world more than 300 million people affected. It is likely that this number will double in the coming decades if no measures are taken. For this reason WHO has made efforts to encourage companies, universities and researchers to create diagnostic and monitoring techniques that have features such as: low cost, simple and fast execution and portability to respond to global health concerns, particularly in underdeveloped countries.

In this work microfluidic devices have been developed from the combination of Whatman n^o1 paper substrate and biopolymer poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)], which have the characteristics indicated by the WHO and still have the advantage of being biodegradable.

The method of manufacturing these devices is based on the impregnation of paper with poly-3-hydroxybutyrate making it hydrophobic. Overlapping this paper with tape masks Kapton with printed patterns and subjecting them to exposure of ultraviolet radiation and ozone (UV-O₃) are created channels and hydrophilic tests areas bounded by hydrophobic barriers of P(3HB).

The developed devices were applied to the detection and quantification of glucose in aqueous solutions using colorimetric assays. Through the reaction between the analyte and the indicator oxidation/reduction and a solution of enzymes immobilized in test zones, there is a color change that is proportional to the initial concentration of glucose.

The Results of the devices were visually examined and subsequently scanned and processed using imaging software *Image J*.

Keywords: diabetes, Whatman n^o1 paper substrate, poly-3-hydroxybutyrate, exposure UV-O₃, microfluidic devices, colorimetric detection.

Lista de Acrónimos

- ATR** – Reflectância Total Atenuada (do inglês, *Attenuated Total Reflectance*)
- AKD** – Dímero de Alquil Ceteno (do inglês, *Alkyl Ketene Dimer*)
- CENIMAT** – Centro de Investigação de Materiais
- CRT** – Tubo de Raios Catódico (do inglês, *Cathode Ray Tube*)
- DRX** – Difracção de raios-X
- DSC** – Calorimetria Diferencial de Varrimento (do inglês, *Diferencial Scanning Calorimetry*)
- DTA** – Análise Térmica Diferencial (do inglês, *Differential Thermal Analysis*)
- EDS** – Espectroscopia Dispersiva de raios-X (do inglês, *Energy Dispersive Spectroscopy*)
- FTIR** – Espectroscopia do Infravermelho por Transformada de Fourier (do inglês, *Fourier Transform Infrared*)
- LFA** – Teste de Fluxo Lateral (do inglês, *Lateral Flow Assay*)
- PDI** – Grau de Polidispersão (do inglês, *Polydispersity Index*)
- PDMS** – Polidimetilsiloxano (do inglês, *Polydimethylsiloxane*)
- PHAs** – poli-hidroxialcanoatos (do inglês, *Polyhydroxyalkanoates*)
- P(3HB)** – Poli-3-Hidroxibutirato (do inglês, *Poly-3-Hydroxybutyrate*)
- POC** – do inglês, *Point-of-Care*
- RGB** – Vermelho, Verde e Azul (do inglês, *Red Green Blue*)
- SEM** – Microscopia Electrónica de Varrimento (do inglês, *Scanning Electron Microscopy*)
- SEC** – Cromatografia por Exclusão de Tamanho (do inglês, *Size-Exclusion Chromatography*)
- TA** – Análises Térmicas (do inglês, *Thermal Analysis*)
- TG** – Termogravimetria (do inglês, *Thermogravimetry*)
- TMA** – Análises Termomecânicas (do inglês, *Thermomechanical Analysis*)
- UV-O₃** – Radiação Ultravioleta e Ozono
- μTAS** – Micro Sistemas Completos de Análise (do inglês, *Micro Total Analysis System*)
- μPADs** – Dispositivos de Análise de Microfluídica em Papel (do inglês, *Microfluidic paper-based analytical devices*)
- WCA** – Ângulo de Contacto em Água (do inglês, *Water Contact Angle*)

Lista de Símbolos

A_λ – Absorvância
 C – Concentração
 D – Diâmetro médio do poro
 d – Distância interplanar
 I_0 – Radiação incidente
 I_t – radiação transmitida
 I_{002} – Intensidade no plano cristalográfico (002)
 I_{am} – Intensidade na zona amorfa
 I_c – Índice de cristalinidade
 eV – electrão volt
 l – Percurso óptico
 $l(t)$ – Distância percorrida
 m/m – Massa por massa
 \bar{M}_w – Peso molecular médio
 \bar{M}_n – Peso molecular numérico médio
 N_{CS} – Número médio de cisões de cadeias
 n_i – Ordens de reflexão
 R_e – Número de Reynolds
 r – Raio de capilaridade
 T_{max} – Temperatura máxima
 T_f – Temperatura de fusão
 Tr – Transmitância
 $u. a.$ – Unidade arbitrária
 X_c – Grau de cristalinidade
 γ – Tensão superficial
 γ_{GS} – Tensão superficial da interface gás-sólido
 γ_{GL} – Tensão superficial da interface gás-líquido
 γ_{LS} – Tensão superficial da interface líquido-sólido
 η – Viscosidade
 ρ – Densidade
 λ – Comprimento de onda
 θ_c – Ângulo de contacto
 ϵ_λ – Absortividade molar
 Δm – Perda de massa
 ΔH_f – Entalpia de fusão cristalina
 ΔH_0 – Entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina

Índice de Matérias

Agradecimentos	III
Resumo.....	V
Abstract	VII
Lista de Acrónimos	IX
Lista de Símbolos.....	XI
Índice de Matérias	XIII
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas.....	XIX
Enquadramento e Objectivos.....	XXI
1 Introdução	1
1.1 Estado de arte	1
1.2 Fundamentos Teóricos	4
1.2.1 Papel.....	4
1.2.2 Composição do papel.....	5
1.2.3 Processo de fabrico do papel.....	7
1.2.4 Poli-3-hidroxitirato [P(3HB)].....	9
1.2.5 Microfluídica	9
1.2.6 Microfluídica em papel.....	11
1.2.7 Biossensores de papel	11
1.2.8 Glucose.....	13
2 Métodos de Caracterização dos Materiais.....	15
2.1 Microscopia electrónica de varrimento.....	15
2.1.1 Espectroscopia dispersiva de raios-X	17
2.2 Difração de raios-X.....	18
2.3 Ângulo de contacto	19
2.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier modo ATR	20
2.5 Análises Térmicas	22
2.5.1 Análise Termogravimétrica (TG)	22
2.5.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DCS)	23
3 Materiais e Métodos Experimentais	25
3.1 Materiais hidrófilos.....	25

3.2 Material hidrófobo	26
3.3 Preparação do papel hidrófobo	26
3.4 Padronização de canais 2D	27
3.4.1 Tratamento com radiação UV e Ozono (UV-O ₃)	28
3.5 Dispositivo para medir a concentração de glucose em soluções aquosas.....	29
4 Apresentação e Discussão de Resultados	33
4.1 Caraterização dos substratos de papel	33
4.1.1 Microscopia electrónica de varrimento	33
4.1.2 Difraccção de raios-X	34
4.1.3 Ângulo de contacto	35
4.1.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier modo ATR.....	36
4.1.5 Análises térmicas	38
4.2 Caracterização do Filme P(3HB)	40
4.2.1 Microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios-X.....	41
4.2.2 Difraccção de raios-X	42
4.2.3 Ângulo de contacto	43
4.2.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier modo ATR.....	44
4.2.5 Análises térmicas	45
4.3 Caracterização do papel Whatman nº1 impregnado com polihidroxibutirato [P(3HB)].....	49
4.3.1 Microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios - X.....	49
4.3.2 Caracterização das superfícies pós-degradação	51
4.4 Ensaios colorimétricos	54
5 Conclusões e Perspectivas Futuras.....	61
Bibliografia	63
Anexos.....	69

Índice de Figuras

Figura 1.1 – Dispositivos microfluídicos criados por Martinez <i>et al.</i> usando a técnica de fotolitografia com barreiras de SU-8 fotoresiste. Na imagem a) ocorreu absorção da tinta vermelha <i>Waterman</i> por acção capilar. A imagem b) mostra o dispositivo com duas zonas de testes onde foram depositados reagentes para detectar glucose e proteína e uma zona de controlo. A imagem c) mostra o resultado obtido após o contacto de uma amostra artificial de urina com o dispositivo (Adaptado de [4]).	2
Figura 1.2- Exemplo da secção transversal de uma folha de papel onde se pode observar a rede de fibras de celulose com estrutura em camadas. Escala da barra = 25 μm (Adaptado de [21]).	4
Figura 1.3- Esquema ilustrativo das fibras e estrutura da celulose (Adaptado de [24]).	6
Figura 1.4 - Ilustração química dos compostos- hemicelulose e lenhina- presentes nas paredes das células vegetais (Adaptado de [25], [26]).	6
Figura 1.5 - Representação simplificada e ilustrativa dos processos efectuados na formação do papel.	8
Figura 1.6 – Estrutura da unidade repetitiva do <i>poli-3-hidroxibutirato</i> [P(3HB)] (Adaptado de [29])	9
Figura 1.7– Representação esquemática de um biossensor.	13
Figura 1.8- Reações enzimáticas que estão na base dos ensaios colorimétricos para determinação da concentração de glucose em soluções biológicas [46].	14
Figura 2.1 – Tipos de electrões e radiações que podem ser emitidos por uma amostra quando submetida a um feixe de electrões.	16
Figura 2.2 – A) Esquema representativo dos principais componentes de um SEM [48] ; B) Equipamento de SEM de Carl Zeiss AURIGA CROSSBEAM SEM-FIB usado na caracterização dos materiais utilizados neste trabalho.	17
Figura 2.3 - A) Representação geométrica da lei de Bragg. B) Equipamento de DRX, <i>X'Pert Pro</i> da <i>PANalytical</i> utilizado neste trabalho.	19
Figura 2.4 – A) Esquema representativo da relação entre o ângulo de contacto e as tensões superficiais; B) Equipamento OCA 20 da Data Physics utilizado na medição do ângulo de contacto dos materiais utilizados neste trabalho.	20
Figura 2.5 – Ilustração da definição da transmitância e absorvância.	21
Figura 2.6– A) Representação de um sistema de reflectância total atenuada (ATR) [51]. B) Equipamento de FTIR <i>Nicolet 6700 FTIR</i> da <i>Thermo ELECTRON CORPORATION</i> com acessório ATR de cristal de diamante.	22
Figura 2.7 - Equipamento <i>STA 449 F3 Jupiter</i> da <i>NETZSCH</i> utilizado neste trabalho	23
Figura 3.1 - Forma do biopolímero P(3HB) recebido.	26
Figura 3.2 - Representação das etapas realizadas na preparação do papel hidrófobo.	27
Figura 3.3 - Representação das etapas realizadas na padronização e criação de canais 2D: A) preparação do papel hidrófobo e da máscara de fita de kapton; B) Sobreposição da máscara de	

kapton com papel hidrófobo; C) Exposição de B) à radiação UV e ozono e C) resultado da criação de zonas hidrófilas-hidrófobas.	28
Figura 3.4 – Equipamento <i>novascan PSD-UV</i> de Novascan Technologies Designs usado neste trabalho.....	28
Figura 3.5 - Representação por etapas do processo de fabricação de dispositivos para medir concentrações de glucose em soluções aquosas.....	29
Figura 3.6 - Disposição dos indicadores de oxidação-redução no biossensor de glucose [46].	30
Figura 4.1 – Imagens obtidas por SEM: A) papel Whatman nº1; B) papel filtro de laboratório ..	34
Figura 4.2– Difractograma de: A) Papel Whatman nº1 e B) Papel filtro Laboratório.....	35
Figura 4.3– Ângulos de contacto referentes aos substratos Whatman nº 1 (A) e filtro Laboratório (B).....	36
Figura 4.4 - Espectros de FTIR-ATR dos substratos de papel Whatman nº1 e filtro de laboratório.	37
Figura 4.5 - Espectros de FTIR-ATR do papel Whatman nº1 e papel filtro de laboratório expostos a diferentes tempos de UV-O ₃	38
Figura 4.6 – A) Curvas de TG (traço contínuo) e DSC (traço cheio) do papel Whatman nº1; B) Curvas de TG (traço contínuo) e DSC (traço cheio) do papel filtro de laboratório.	38
Figura 4.7– A) Imagens de SEM das células da Bateria <i>C. necator</i> DSM 428 com P(3HB) armazenado (esquerda) e grânulos de P(3HB) dentro das células (direita); B) Forma natural do P(3HB) antes de ser dissolvido e C) Filme de P(3HB)	41
Figura 4.8 – A) Imagem do Filme P(3HB) obtida por SEM e B) Espectro de EDS do Filme P(3HB).	42
Figura 4.9 – Difractograma do Filme P(3HB).	43
Figura 4.10– Ângulo de contacto do Filme P(3HB).	43
Figura 4.11- A) Espectro de FTIR-ATR do filme obtido a partir da solução de P(3HB) e B) estrutura química do polímero P(3HB).	44
Figura 4.12- Espectros de FTIR-ATR dos filmes de P(3HB) submetidos a diferentes tempos de UV-O ₃	45
Figura 4.13 – Análise termogravimétrica dos filmes de P(3HB): A) filme sem tratamento com UV-O ₃ e B) filmes tratados com diferentes tempos de UV-O ₃	46
Figura 4.14 – Análise termogravimétrica de grânulos de P(3HB) puro (adaptado de [75]).	46
Figura 4.15 – Análise de calorimetria diferencial de varrimento dos filmes do biopolímero P(3HB): A) filme sem tratamento com UV-O ₃ e B) filmes com diferentes tempos de tratamento com UV-O ₃	48
Figura 4.16 – Comparação morfológica entre o papel Whatman nº1 (A,B) e o papel Whatman nº 1 impregnado com P(3HB) (C,D,E).	49
Figura 4.17– A) Imagem do papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB); B) respectivo espectro de EDS; C) Mapeamento de Carbono e D) Mapeamento de oxigénio.....	50
Figura 4.18 – Amostra de papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB) e tratado com UV- O ₃ : A) 30 minutos; B) 60 minutos; C) 90 minutos e D) 120 minutos.	51

Figura 4.19 - A) Análise de FTIR-ATR do papel Whatman nº1 e do papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB); B) FTIR-ATR do papel Whatman nº 1 com P(3HB) submetido a diferentes tempos de tratamento com UV-O3 e C) ampliação da região 1250-2000 cm ⁻¹ da imagem B.....	53
Figura 4.20 – Biossensores de papel com os resultados obtidos para diferentes concentrações de glucose.....	55
Figura 4.21 – Gráficos da análise RGB das zonas de testes correspondentes ao indicador AB, AB+KI e KI.	56
Figura 4.22 - Rectas de calibração relativas ao canal vermelho, verde e azul do indicador AB.	57
Figura 4.23 - Curvas de calibração relativas ao canal vermelho, verde e azul do indicador AB+KI	58
Figura 4.24 – Curvas de calibração relativas ao canal vermelho, verde e azul do indicador KI.	59

Índice de Tabelas

Tabela 1.1 - Comparação das técnicas de padronização de zonas hidrófilas e hidrófobas utilizadas em papel para criar dispositivos microfluídicos (Adaptado de [2]).	3
Tabela 1.2 - Composição química de algumas fontes naturais com conteúdo de celulose (Adaptado de [27]).	7
Tabela 3.1 - Propriedades macroscópicas dos substratos hidrófilos utilizados neste trabalho [46], [55].	25
Tabela 3.2 – Soluções padrão de glucose preparadas para testes colorimétricos.	30
Tabela 4.1 – Propriedades térmicas e grau de cristalinidade dos filmes de P(3HB) na ausência e na presença de tratamento nos tempos indicados.	48
Tabela 4.2- Valores de WCA para amostras com e sem tratamento nos tempos indicados	52

Enquadramento e Objectivos

Nos últimos anos têm-se realizado diversos estudos relacionados com a prevenção e tratamento de estados patológicos. O diagnóstico precoce e a monitorização do estado de saúde da população são factores determinantes para a prevenção e o tratamento eficaz de doenças. É de referir que a detecção de uma doença na sua fase inicial pode diminuir substancialmente os custos associados ao seu acompanhamento e tratamento. Vários métodos de detecção de marcadores, que indiquem estados patológicos, têm sido amplamente estudados com o objectivo de desenvolver testes de diagnóstico precisos e precoces. Todavia torna-se primordial a disponibilização de métodos de diagnóstico e monitorização de baixo custo e de simples execução. A própria organização mundial de saúde (OMS) tem vindo a incentivar as empresas, as instituições, as universidades e os investigadores a desenvolverem tecnologias inovadoras que respondam aos interesses globais de saúde, particularmente nos países em vias de desenvolvimento, que deverão ter em conta algumas características relevantes tais como: baixo custo, rapidez de execução, robustez e simples execução, para que possam ser utilizadas nestes países.

Neste trabalho foi, portanto, explorado o desenvolvimento de dispositivos de microfluídica em papel tendo em conta as características atrás mencionadas. Dado que se trata de uma ciência recente em que se pretende trabalhar com materiais poliméricos em conjugação com conceitos fisiológicos e biológicos faz com que este trabalho se adeque ao perfil de um engenheiro biomédico.

Deste modo, para a sua concretização foram estabelecidos os seguintes objectivos:

- Estudo e caracterização de substratos de papel a utilizar;
- Preparação e caracterização do substrato hidrófobo;
- Impregnação do polímero hidrófobo na rede fibrosa do papel;
- Criação de canais e zonas de testes hidrófilas através da exposição à radiação UV e ozono;
- Prova de conceito: aplicação do dispositivo de microfluídica em papel à detecção e quantificação de glucose em soluções aquosas.

1 Introdução

A microfluídica em papel é uma técnica recente que utiliza como suporte um material bastante comum na nossa civilização e extremamente barato- o papel - para se definirem microcanais e zonas de testes hidrófilas, delimitadas por paredes ou regiões hidrófobas. Quando uma determinada amostra, por exemplo, de sangue, urina, saliva ou outros fluidos fisiológicos, é posta em contacto com estes microcanais hidrófilos, ocorre a sua absorção e condução por capilaridade através de zonas predefinidas, sem necessidade de se recorrer a bombas externas como acontece em microfluídica convencional. Nestas zonas de testes podem ocorrer reacções entre determinados componentes das amostras e reagentes imobilizados resultando numa alteração na cor dessas zonas que pode ser facilmente comparada com uma referência de cores impressa no próprio dispositivo.

Têm-se realizado diversos estudos nesta área, que tem sido uma área de estudo por excelência. Alunos do centro de investigação de materiais (CENIMAT) - da Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa - desenvolveram dispositivos microfluídicos em papel através da técnica de impressão a cera [1], uma de entre várias que se encontra na literatura [2], para criarem barreiras hidrófobas e assim confinar os fluidos nas zonas de testes. No entanto, para este trabalho em particular pretende-se desenvolver dispositivos de microfluídica para testes de diagnóstico através da conjugação do substrato, papel, com o material polimérico, *poli-3-hidroxibutirato* [P(3HB)]. Este polímero tem propriedades interessantes tais como a biodegradabilidade e biocompatibilidade, que juntamente com as características do papel, são condições importantes para aplicações do tipo *Point-of-Care* (POC). Por último serão desenvolvidos dispositivos microfluídicos em papel integrando todos os componentes necessários para determinar a concentração de glucose em soluções aquosas.

1.1 Estado de arte

Nas últimas duas décadas tem-se verificado um interesse cada vez maior pelos dispositivos microfluídicos, também designados de micro sistemas completos de análise (μ TAS, do inglês *Micro Total Analysis System*) ou dispositivos de análise de microfluídica em papel (μ PADs, do inglês *Microfluidic paper-based analytical devices*). O primeiro dispositivo microfluídico em papel foi criado em 2007 e a sua invenção é atribuída ao grupo de Whitesides da Universidade de Harvard nos Estados Unidos da América [2], [3]. A Figura 1.1 mostra o dispositivo microfluídico em papel que foi objectivado para medir a concentração da glucose e proteína presente numa amostra artificial de urina. Uma amostra de 5 μ L de volume foi colocada na zona de depósito deste dispositivo que, seguidamente, por acção capilar, foi conduzida até às zonas de detecção e em contacto com reagentes imobilizados deu origem a uma alteração na cor dessas zonas. Posteriormente este ensaio colorimétrico foi digitalizado

e processado por um computador, determinando assim a concentração dos conteúdos presentes na amostra inicial. A cor branca do papel permitiu um contraste significativo e, consequentemente, melhores resultados nos ensaios colorimétricos [4].

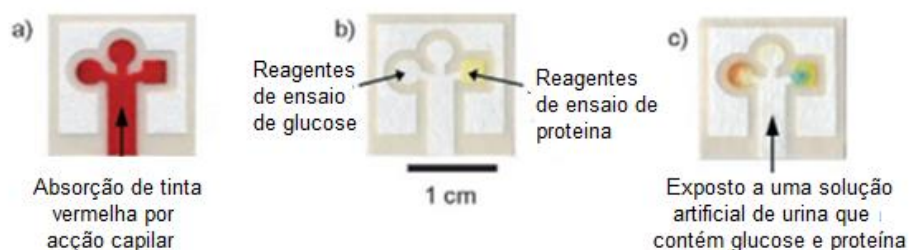
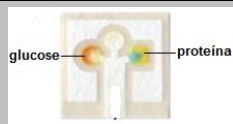
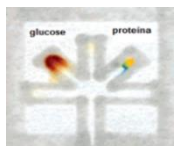
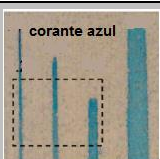
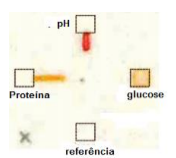
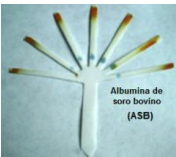
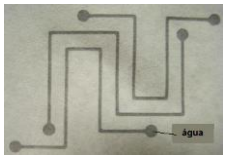
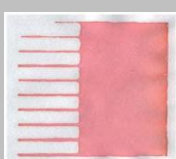


Figura 1.1 – Dispositivos microfluídicos criados por Martinez *et al.* usando a técnica de fotolitografia com barreiras de SU-8 fotoresiste. Na imagem a) ocorreu absorção da tinta vermelha *Waterman* por acção capilar. A imagem b) mostra o dispositivo com duas zonas de testes onde foram depositados reagentes para detectar glucose e proteína e uma zona de controlo. A imagem c) mostra o resultado obtido após o contacto de uma amostra artificial de urina com o dispositivo (Adaptado de [4]).

O princípio fundamental na fabricação destes dispositivos assenta na criação de canais hidrófilos de dimensões milimétricas delimitados por regiões hidrófobas. Actualmente, na literatura, existem dezenas de técnicas com diferentes abordagens para a fabricação de dispositivos de microfluídica em papel. Na Tabela 1.1 encontram-se representadas as técnicas, os agentes hidrófobos utilizados em cada uma delas, os princípios de padronização e as abordagens utilizadas na padronização. Estas técnicas podem ser divididas em três grandes categorias, consoante a acção realizada por cada agente hidrófobo sobre as fibras de celulose: (i) bloqueio físico dos poros do papel, que utiliza agentes como fotoresiste (i.e. SU-8) ou polidimetilsiloxano (PDMS); (ii) deposição localizada de um reagente hidrófobo, como cera de impressão ou poliestireno e (iii) modificação química da superfície das fibras de celulose, através de agentes reactivos como o Dímero de Alquil Ceteno (AKD, *Alkyl Ketene Dimer*), um aditivo muito importante utilizado na indústria de papel para tornar o papel hidrófobo [2].

Tabela 1.1 - Comparação das técnicas de padronização de zonas hidrófilas e hidrófobas utilizadas em papel para criar dispositivos microfluídicos (Adaptado de [2]).

Técnicas de fabricação	Agente hidrófobo	Princípio de padronização	Abordagem de padronização	Imagem do dispositivo
Fotolitografia [4], [5]	Fotoresiste (e.g., SU-8)	Bloqueio físico Dos poros do papel	Tornar hidrófobo depois hidrófilo	
Deposição [6]	PDMS	Bloqueio físico dos poros do papel	Criação de barreiras hidrófobas	
Impressão Flexográfica [7]	Poliestireno	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Criação de barreiras hidrófobas	
Gravação a jacto de tinta [8], [9]	Poliestireno	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Tornar hidrófobo depois hidrófilo	
Tratamento por plasma [10]	AKD	Modificação química da superfície das fibras	Tornar hidrófobo depois hidrófilo	
Corte de papel [11]	-	Bloqueio físico dos poros do papel	Isolar canais hidrófilos	
Impressão a cera [12]–[14]	Cera	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Criação de barreiras hidrófobas	
Impressão a jacto de tinta[15], [16]	AKD	Modificação química da superfície das fibras	Criação de barreiras hidrófobas	
Serigrafia [17]	Cera	Deposição física de reagente na superfície das fibras	Criação de barreiras hidrófobas	
Tratamento por laser[18]	Depende do tipo de papel	Bloqueio físico dos poros de papel	Tornar hidrófobo depois hidrófilo	

Todas as técnicas apresentadas na Tabela 1.1 têm as suas vantagens e desvantagens. A escolha de uma em detrimento das outras deve ser realizada de acordo com os objectivos que se pretendem para a fabricação de um dispositivo microfluídico em papel. A técnica que se quer implementar neste trabalho, e que não se encontra referida na Tabela 1.1, passa pela conjugação do substrato com o polímero P(3HB), isto é, a modificação do papel com *poli-3-hidroxibutirato*, tornando-o hidrófobo. Apesar de esta técnica ser recente e ainda pouco explorada, apresenta-se como sendo promissora e com bastante potencial para o desenvolvimento de dispositivos em microfluídica em papel. Na literatura encontrou-se um trabalho desenvolvido por Maria P. Sousa e João F. Mano que consiste na produção de papel super-hidrófobo para construir material de laboratório para manipulação, transporte, mistura e armazenamento de líquidos [19], [20]. Este grupo focalizou-se mais na preparação dos substratos de papel através da modificação das suas superfícies com o P(3HB) e na optimização das metodologias/técnicas utilizadas, deixando deste modo uma ideia e base de estudo que se pretende explorar neste trabalho para criação de dispositivos de microfluídica em papel para medir concentrações de glucose em soluções aquosas.

1.2 Fundamentos Teóricos

1.2.1 Papel

O papel é um material que tem acompanhado o homem ao longo das gerações e, no entanto, nem sempre é visto como um material particularmente complexo. Contudo, a sua natureza vegetal confere-lhe uma enorme complexidade tanto a nível morfológico como químico.

Pode-se definir o papel como um material fino e flexível, composto por uma rede de fibras de celulose resultante da drenagem de uma pasta aquosa de celulose proveniente de plantas. O resultado que se obtém é uma rede de fibras interligadas com uma estrutura em camadas de aproximadamente 30 – 300 μm de espessura. Dado que o diâmetro de uma fibra individual se encontra entre 10 a 50 μm , numa folha de papel de espessura 100 μm espera-se 5 a 10 fibras de celulose [21].

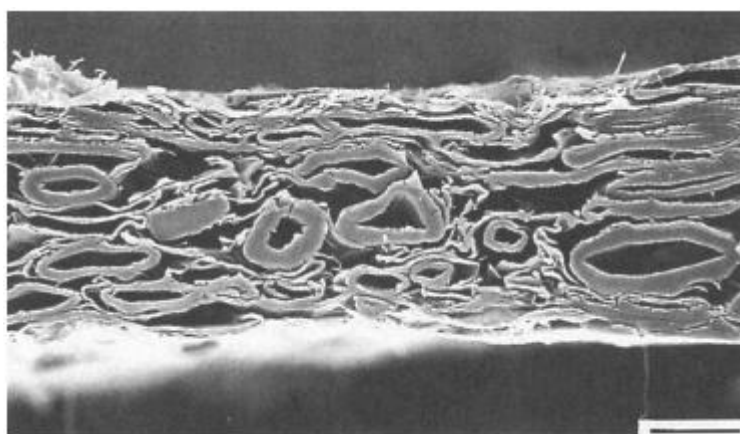


Figura 1.2- Exemplo da secção transversal de uma folha de papel onde se pode observar a rede de fibras de celulose com estrutura em camadas. Escala da barra = 25 μm (Adaptado de [21]).

Em que altura e onde é que o papel foi introduzido na nossa civilização não se sabe com toda a certeza, porém, segundo a definição dada anteriormente, a fabricação do papel foi iniciada na China há mais de dois mil anos. O papel para além de ser um meio de escrita e impressão também pode ser utilizado para filtração, isolamento eléctrico e embalagens, entre outros [21].

1.2.2 Composição do papel

As fibras que constituem o papel são extraídas das paredes das células vegetais através de processos mecânicos e/ou químicos [22].

A composição química do papel depende da espécie vegetal utilizada, todavia, o seu principal constituinte é a celulose. Nas paredes das células vegetais, para além da celulose, destacam-se outros componentes maioritários como: hemicelulose e lenhina, e alguns componentes minoritários como: extractos orgânicos e inorgânicos [22].

A celulose é a biomolécula mais abundante na natureza e desempenha uma função estrutural nas paredes das células vegetais. É um polissacarídeo linear e homogéneo cujo monómero é β -1,4-D-glucopirranose. Este tipo de ligação $\beta(1 \rightarrow 4)$ proporciona uma linearidade das moléculas de celulose. A proximidade entre as moléculas de celulose e a presença de grupos hidroxilo (OH) na sua estrutura favorece a formação de ligações de pontes de hidrogénio entre as cadeias e, por conseguinte, a formação de microfibrilas, que são responsáveis pela formação da unidade cristalina da celulose (Figura 1.3). Quanto ao grau de polimerização e índice de cristalinidade deste polissacarídeo situa-se entre 10000-15000 e 50-90%, respectivamente, e, devido ao elevado grau de polimerização e cristalinidade, as fibras de celulose são mecanicamente mais fortes e resistentes [21], [23].

A hemicelulose é formada por um conjunto heterogéneo de polissacarídeos com cadeias mais pequenas do que as de celulose (Figura 1.4). Tem um baixo peso molecular e o grau de polimerização situa-se entre 100-200. A função que desempenha nas células vegetais não é, todavia, amplamente conhecida embora se suspeite ter um papel importante no transporte de água. Existem evidências que a sua presença na estrutura do papel tem uma correlação positiva com a resistência à tracção do papel [21].

A lenhina é um polímero aromático que apresenta uma estrutura supramolecular desorganizada e amorfa (Figura 1.4). A presença desta substância nas células vegetais possibilita à estrutura fibrosa da madeira resistência mecânica e protecção contra microrganismos patogénicos. Contudo, devido ao seu alto conteúdo na estrutura da madeira, é imprescindível a sua remoção, pois oxida por processos fotoquímicos tornando o papel amarelado e descolorido [20].

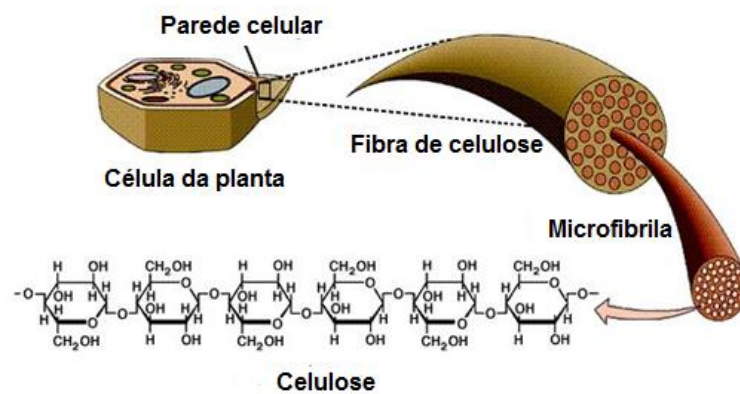


Figura 1.3- Esquema ilustrativo das fibras e estrutura da celulose (Adaptado de [24]).

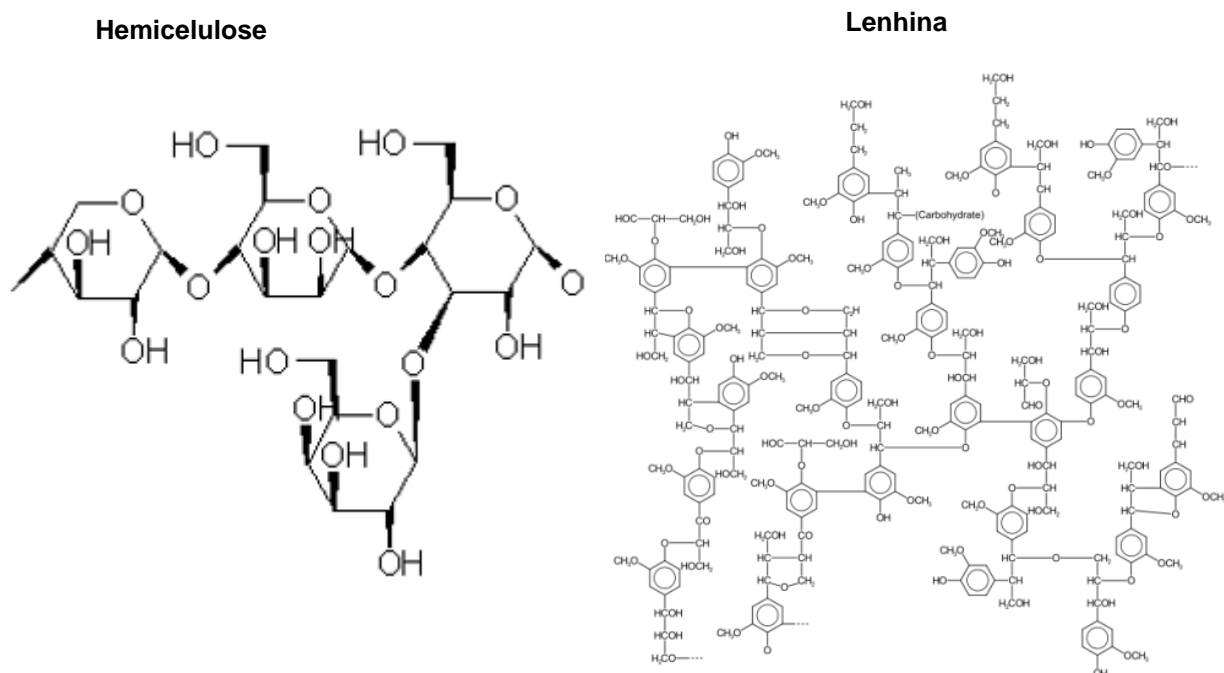


Figura 1.4 - Ilustração química dos compostos- hemicelulose e lenhina- presentes nas paredes das células vegetais (Adaptado de [25], [26]).

Na Tabela 1.2 encontram-se as principais fontes de fibras celulósicas e as respectivas percentagens das substâncias que as compõem. Contudo somente algumas destas fontes de fibras são comercialmente importantes, sendo o algodão e a madeira as mais relevantes. As características da madeira, isto é, a sua configuração e as dimensões das suas fibras, fazem deste material a principal fonte de extracção de fibras para o fabrico do papel.

A maior parte do papel produzido tem origem em plantas lenhosas que se dividem em plantas de madeira macia (por exemplo os pinheiros) e madeira dura (por exemplo os eucaliptos). As fibras provenientes da madeira macia são mais longas e resistentes enquanto que as provenientes da madeira dura são relativamente curtas. Deste modo, a madeira macia tem sido a mais utilizada no fabrico do papel uma vez que as suas fibras são, como referimos, mais longas e apresentam uma estrutura menos complexa [21].

Tabela 1.2 - Composição química de algumas fontes naturais com conteúdo de celulose (Adaptado de [27]).

Fonte	Composição (%)			
	Celulose	Hemicelulose	Lenhina	Extratos
Madeira macia	40-44	25-29	25-31	1-5
Madeira dura	43-47	25-35	16-24	2-8
Fibra de coco	32-43	10-20	43-49	4
Algodão	95	2	1	0,4
Cana-de açúcar	40	30	20	10

1.2.3 Processo de fabrico do papel

As árvores constituem a principal fonte de matéria-prima para as indústrias do papel. Deste modo, a qualidade e propriedades do papel produzido depende da espécie vegetal considerada, ou seja, do tipo da madeira utilizada. Na Figura 1.5 estão representadas de modo simplificado as etapas de um processo de fabrico do papel.

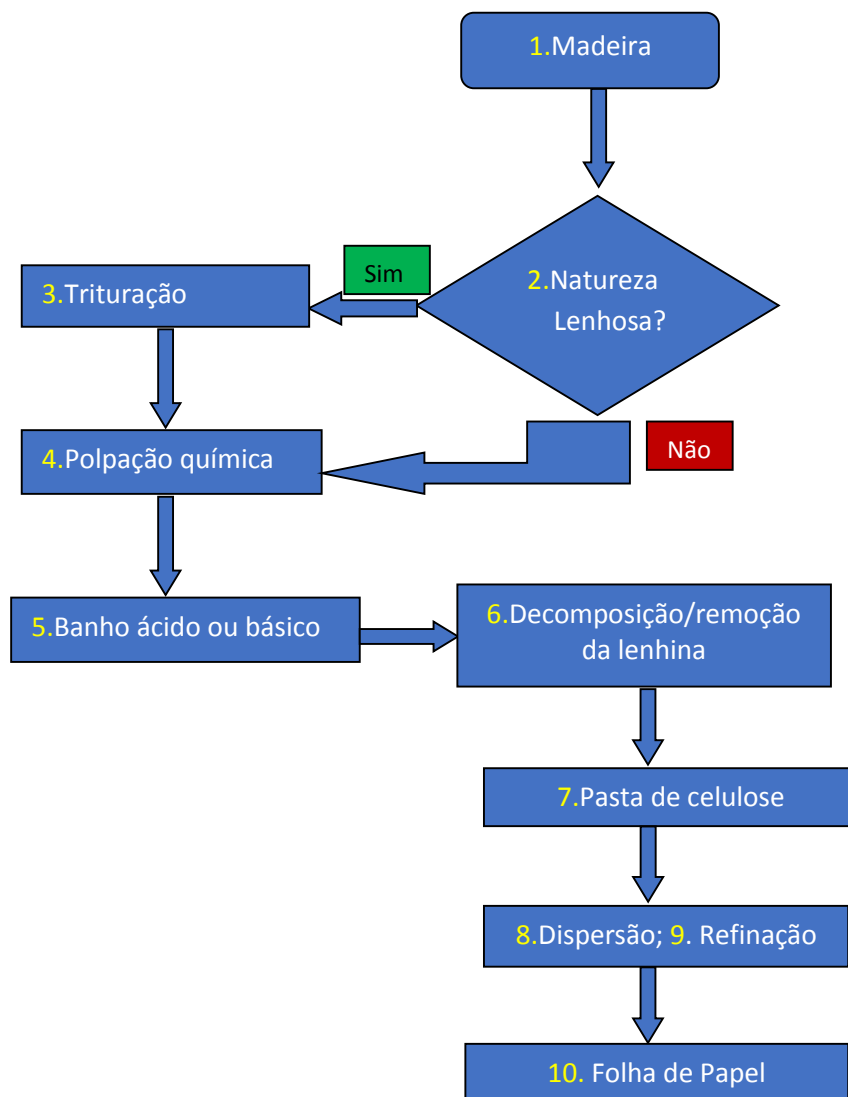


Figura 1.5 - Representação simplificada e ilustrativa dos processos efectuados na formação do papel.

O fabrico do papel inicia-se com a trituração da madeira de tamanhos predefinidos, no caso de a matéria ter origem em plantas lenhosas. O processo subsequente é a polpação química. Trata-se de submeter a matéria danificada mecanicamente a um banho ácido (*sulfite pulping*) ou básico (*Kraft pulping*), que permite a decomposição da lenhina presente na madeira. Todo este processo é apoiado por meio do aumento da temperatura e pressão. A pasta resultante, do processo da polpação química, pode apresentar uma certa aparência acastanhada devido à presença residual da lenhina pelo que é comum ser submetida a um processo de branqueamento.

Subsequentemente vêm os processos de dispersão e refinação da pasta de celulose. O processo de dispersão, também designado de desagregação, assenta na desintegração das fibras da pasta de celulose em meio aquoso com vista a obter a individualização e homogeneização destas fibras. Na refinação, através de processos mecânicos e hidráulicos, são alteradas as características físicas das

fibras com o intuito de conferir as propriedades desejadas ao papel a formar. Por fim, a água da pasta envolvida neste processo é drenada durante a sua passagem numa plataforma rolante e depois de uma fase de secagem é obtida a folha de papel [21], [28].

1.2.4 Poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)]

Poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)] é um poliéster linear de ácido D (-) -3-hidroxibutírico que foi isolado e caracterizado pela primeira vez em 1925 através da bactéria *Bacillus megaterium* pelo microbiologista francês Maurice Lemoigne [29]. Este polímero, que pertence a família dos polihidroxicanoatos (PHAs), pode ser acumulado por diversos microorganismos em grande quantidade sem afectar a pressão osmótica das células. Encontra-se na fórmula de grânulos intracelulares (que pode chegar a constituir aproximadamente 80% da massa seca da célula) com a função principal de fornecer reservas de carbono e energia na ausência de fontes comuns de energia. A Figura 1.6 mostra a estrutura da unidade repetitiva do poli-3-hidroxibutirato.

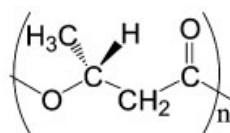


Figura 1.6 – Estrutura da unidade repetitiva do *poli-3-hidroxibutirato* [P(3HB)] (Adaptado de [29])

O P(3HB) é caracterizado por possuir peso molecular médio entre 10^4 e 10^5 g.mol⁻¹, grau de cristalinidade entre 40 e 80 %, ponto de fusão entre 171 e 182 °C [30]. O seu alto ponto de fusão e o facto de poder ser degradado por organismos do solo – propriedades que correspondem à termoplasticidade e biodegradabilidade respectivamente – são factores que têm atraído significativamente o interesse comercial deste biopolímero. No entanto, ainda não existe uma afirmação categórica deste polímero no mercado em consequência do seu alto custo de produção que envolve a selecção do tipo de microorganismo, do substrato e do método de extracção.

Na produção de P(3HB) é comum a utilização de açúcares (glicose e sacarose) como fontes de carbono. Tendo em conta que estas fontes possuem custos elevados, fontes de carbono alternativas tais como, resíduos industriais que contêm óleos e/ou subprodutos, têm sido propostos por um grupo de investigadores: Verlinden et al., 2011 e Cruz et al., 2014 [31], [32]. Neste trabalho, o P(3HB) utilizado foi produzido pela equipa de investigação da Professora Doutora Maria da Ascensão Reis do Departamento de Química da FCT (DQ/FCT) através de resíduos de óleos alimentares.

1.2.5 Microfluídica

A microfluídica pode ser definida como a ciência dos sistemas nos quais o comportamento dos fluidos difere da teoria convencional, escala macroscópica, devido às pequenas dimensões destes sistemas. O processamento e manipulação dos fluidos são explorados em dispositivos cujos canais

têm dimensões de dezenas a centenas de micrómetros [33]. Na escala microscópica, os fluidos são governados por forças diferentes das consideradas à escala macroscópica. Para um dado volume de fluido podem actuar dois tipos de forças exteriores: as forças de massa ou volume e as forças de contacto ou superfície. Entretanto para baixos volumes de fluidos as forças de superfície, como a tensão superficial e a viscosidade, são mais dominantes e significativas do que as de volume, como a gravidade e a inércia, que são significativas na presença de grandes massas [34], [35]. Outra característica importante de um fluido é o seu fluxo, que pode ser descrito pelo número de Reynolds [36]:

$$R_e = \frac{\rho v D}{\mu} \quad \text{Eq: 1. 1}$$

A Equação 1.1 descreve o número de Reynolds (R_e) em que ρ é a densidade do fluido, v a velocidade média do fluido, D o diâmetro médio do tubo e μ a viscosidade dinâmica do fluido. O fluxo de um fluido em canais submilimétricos, idênticos aos utilizados em microfluidica, apresenta um número de Reynolds na ordem de 10^2 , sendo o número de Reynolds proporcional ao diâmetro do canal. Nesta ordem de grandeza o fluxo é considerado essencialmente laminar. Por outro lado, o fluxo de um fluido num macro sistema é quase sempre considerado turbulento, com número de Reynolds maior que 10^3 . Uma das vantagens dos micro sistemas, por exemplo, a microfluidica, é a possibilidade de surgimento de fluxos laminares que permitem transporte de moléculas e partículas de um modo mais estável através da movimentação regular [36].

Os primeiros dispositivos microfluídicos tinham como principais substratos silício, vidro e quartzo. Entretanto estes materiais apresentam características pouco vantajosas para a concepção de sistemas microfluídicos, como por exemplo, o custo – que é relativamente elevado – e a velocidade de produção em larga escala – que é baixa. Na última década do século XX constatou-se uma necessidade de introduzir substratos de natureza polimérica, como polidimetilsiloxano (PDMS), que colatassem as imperfeições dos anteriores substratos e acrescentassem características como a precisão, a resolução e a qualidade na concepção de canais [33], [37].

Actualmente a microfluídica encontra-se presente essencialmente no domínio da biologia, química, medicina e microelectrónica. A utilização de dispositivos microfluídicos com o intuito de conduzir investigações nestas áreas tem vantagens significativas. Primeiro, porque o volume dos fluidos requeridos dentro desses micro canais é relativamente pequeno e, por conseguinte, permite reduzir drasticamente o consumo dos reagentes e amostras a utilizar. Isto é especialmente significativo para reagentes caros. Além de serem dispositivos pequenos que têm propriedades de portabilidade - condição pertinente nas aplicações de microfluidica *Point-of-Care* (POC) – os seus resultados podem ser obtidos num tempo muito reduzido. Estas propriedades, associadas à simplicidade da sua análise e facilidade de produção em massa, são vantagens que tornam a microfluídica muito atractiva.

1.2.6 Microfluídica em papel

A microfluídica em papel é uma técnica recente que utiliza papel como substrato para manipular e processar fluidos sem necessidade de se recorrer a bombas e controlos pneumáticos – tal como acontece na microfluídica convencional. Papel proveniente de fibras de celulose é naturalmente hidrófilo e poroso o que possibilita a penetração de líquidos dentro da sua matriz de fibras. Esta rede de fibras dispersas aleatoriamente gera espaços livres que se comportam como tubos capilares cujos diâmetros são muito reduzidos - de dimensão microscópica ou inferior. Através da pressão exercida pelos capilares esses líquidos são conduzidos automaticamente sem recurso a forças externas. É deste modo uma técnica auto-suficiente.

A penetração de uma solução aquosa e o seu consequente movimento na rede celulósica do papel é estudado pela equação de Washburn (Equação 1.2) [15]:

$$l(t) = \sqrt{\frac{\gamma r \cos \theta_c}{2\eta} t} \quad \text{Eq: 1.2}$$

Washburn demonstra que a distancia percorrida, $l(t)$, por um liquido ao penetrar num tubo por acção capilar é directamente proporcional ao raio do capilar, r , ao cosseno do ângulo de contacto, $\cos \theta_c$, e ao rácio entre a tensão superficial, γ , e viscosidade, η . Para materiais porosos que se comportam como um conjunto de capilares cilíndricos, a equação de Washburn descreve a penetração do líquido em função de um tempo t . Caso a superfície do papel apresente um ângulo de contacto superior a 90° , a penetração do líquido não ocorre.

Para além desta característica importante – transporte de líquidos por capilaridade – outras razões fizeram com que o papel fosse o material escolhido para o fabrico de uma nova geração de dispositivos microfluídicos. Algumas dessas razões prendem-se com o facto de o papel ser um material extremamente barato; compatível com a grande maioria de aplicações químicas, bioquímicas e médicas; ter a propriedade de biodegradabilidade e, enquanto suporte para os dispositivos microfluídicos, permitir que os mesmos sejam fáceis de usar, baratos e descartáveis [2].

1.2.7 Biossensores de papel

Um biossensor pode ser definido como um dispositivo analítico que contém um bioreceptor, um sistema de reconhecimento de uma substância biológica, integrado com um transdutor físico-químico, que converte os processos de bioreconhecimento em sinais mensuráveis (Figura 1.7). Os biossensores podem ser agrupados de acordo com o seu tipo de elemento biológico (bioreceptor) ou transdutor. Os bioreceptores podem incluir: enzimas, anticorpos, micro-organismos, tecidos biológicos e organelos e, no caso dos transdutores, os princípios mais utilizados são: medidas ópticas, medidas electroquímicas, medidas calorimétricas e medidas colorimétricas. Conforme o tipo de interação resultante entre um bioreceptor e uma substância a analisar, pode-se classificar o tipo de biossensor. De acordo com a natureza do elemento de reconhecimento biológico os biossensores podem ser definidos como

catalíticos ou de afinidade. Nos biossensores catalíticos, a interacção entre o bioreceptor e o analito resulta na conversão de um substrato, inicialmente não detectado, num produto mensurável. Estes bioreceptores são principalmente enzimas, organelos ou células. Nos biossensores de afinidade, o bioreceptor interage estequiometricamente com o analito em que o equilíbrio é alcançado sem consumo do analito pelo bioreceptor. Como exemplo deste tipo de biossensor, temos a interacção antigénio-anticorpo [38].

O desenvolvimento de biossensores em papel para monitorização ou diagnóstico em saúde permite aproximar-se das directrizes estabelecidas pela OMS na forma de concepção dos métodos de diagnósticos com baixo custo e simples execução em regiões desfavorecidas e com pouca instrumentação. Os biossensores em papel podem ser divididos em três categorias: testes em tira (*dipstick*), testes de fluxo lateral (LFA) e dispositivos de análise de microfluídica em papel (μ PADs), tipo de biossensor desenvolvido neste trabalho. Os testes em tira, cujo melhor exemplo é o teste de medição de pH, são os mais simples uma vez que são baseados na deposição da amostra numa tira de papel com reagentes pré-depositados. Assim como os testes em tira, os de LFA também são dispositivos em que os reagentes se encontram imobilizados mas a amostra depositada tem mobilidade através de um fluxo lateral num percurso pré-definido na membrana de papel. Deste modo, os LFA apresentam benefícios sobre os testes em tira dado que a amostra passa em diversas zonas da membrana do papel interagindo com diversos reagentes armazenados (funções distintas) em instantes diferentes. Particularmente os testes de LFA podem ter formato de sanduíche, formato competitivo e de multi-deteção e normalmente são constituídos por quatro zonas diferentes: a zona de depósito da amostra, a zona de conjugação, a zona de detecção e a zona de absorção. Diversos materiais tais como celulose, fibras de vidro, filtros de celulose e nitrocelulose são utilizados na constituição destas zonas de dispositivos LFA. A principal inconveniência deste biossensor é a impossibilidade de obter uma análise múltipla e quantitativa [39].

Os μ PADs requerem um baixo volume de amostra e permitem obter análises múltiplas e quantitativas, resolvendo assim esses problemas dos testes LFA [39]. Estes dispositivos integram as vantagens do papel e as da microfluídica e têm potenciais aplicações em áreas como: diagnóstico de saúde, análise bioquímica, monitorização ambiental, controlo de qualidade alimentar, análise biomédica, ciência forense [16], [40]–[42].

A detecção de analitos nos dispositivos microfluídicos em papel pode ser realizada através de quatro métodos distintos reportados na literatura: i) detecção colorimétrica, ii) detecção electroquímica iii) detecção quimioluminescente e iv) detecção electroquimioluminescente, no entanto, os métodos que mais se exploram na grande maioria dos projectos desenvolvidos são: a detecção colorimétrica e a detecção electroquímica. A detecção colorimétrica está tipicamente relacionada com reacções químicas e enzimáticas que resultam na alteração da cor dos produtos. Geralmente os resultados podem ser detectados de modo visual ou semi-quantitativo através da comparação com uma escala colorimétrica. A detecção electroquímica é mais sensível permitindo a quantificação de analitos com concentrações da ordem de nM. Em relação à detecção quimioluminescente e electroquimioluminescente são métodos de detecção óptica mais utilizados na microfluídica convencional todavia não têm sido muito explorados na microfluídica em papel [3], [43].

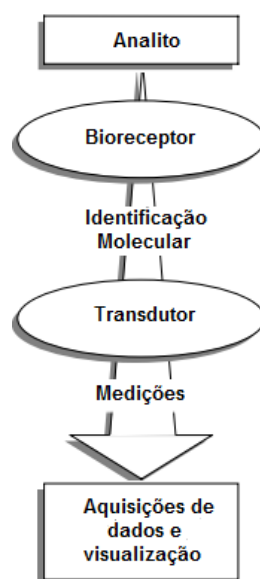


Figura 1.7– Representação esquemática de um biossensor.

1.2.8 Glucose

A glucose é a fonte de energia primária das células e é transportada através da corrente sanguínea dos organismos. A sua medição através dos fluidos fisiológicos humanos é de grande importância no diagnóstico clínico de distúrbios metabólicos. Por exemplo, um dos mais importantes distúrbios trata-se da diabetes *mellitus*, que é caracterizada por níveis elevados de glucose no sangue humano (hiperglicemia). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a diabetes é a doença metabólica mais comum no mundo, com mais de 347 milhões de pessoas afectadas, e se medidas não forem tomadas, este número pode duplicar nas próximas duas décadas [44].

Neste trabalho a detecção e quantificação da glucose serão baseadas em reacções enzimáticas. A glucose, na presença de glucose oxidase, decompõe-se e gera como produto peróxido de hidrogénio que, na presença de indicadores oxidação/redução, provoca uma reacção colorimétrica, catalisada por peroxidase, e que é proporcional à concentração inicial de glucose envolvida neste processo [45]. Na Figura 1.8 estão evidenciadas estas reacções.

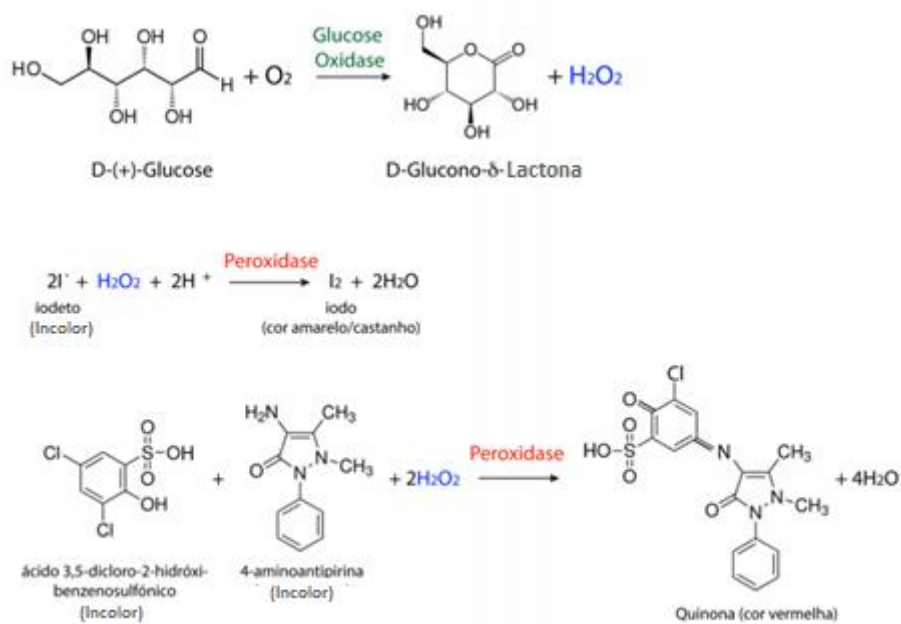


Figura 1.8- Reações enzimáticas que estão na base dos ensaios colorimétricos para determinação da concentração de glucose em soluções biológicas [46].

2 Métodos de Caracterização dos Materiais

Ao longo de um trabalho surge a necessidade de utilização de meios e equipamentos para estudar, conhecer e compreender, a estrutura, a morfologia e a natureza química dos materiais. Este capítulo é dedicado à descrição dos métodos utilizados para caracterizar os substratos de papel e o material polimérico – *poly-3-hidroxibutirato [P(3HB)]* - usados neste trabalho.

2.1 Microscopia electrónica de varrimento

A principal função de qualquer microscópio é tornar humanamente visível o que a olho nu é impossível, por ser muito pequeno para tal. À semelhança da microscopia óptica, que permite obter imagens com ampliação 1000x, a microscopia de varrimento por electrões permite que essas imagens sejam obtidas numa gama extraordinariamente superior (desde 10x a 1000 000x) aliadas ainda à alta resolução e maior profundidade de campo. A microscopia electrónica é uma técnica poderosa e versátil que permite caracterizar morfologicamente materiais e identificar as suas composições químicas e estruturas cristalográficas [47].

O princípio de funcionamento do SEM (*Scanning Electron Microscopy*) consiste na incidência de um feixe de electrões primários numa amostra. A superfície da amostra é percorrida sequencialmente por esse feixe de electrões emitidos termionicamente, acelerados por uma tensão que varia entre 2-4keV e finamente focados através de um sistema de lentes electromagnéticas. A interacção entre os electrões e os elementos da amostra resulta na perda de energia dos electrões que podem ser absorvidos, emitidos, transmitidos ou reflectidos. Desta interacção pode resultar, por parte da amostra, a emissão de diversos tipos de electrões e radiações, entre os quais os electrões retrodifundidos, secundários e de Auger, e radiações de raios – X, de luz visível (catodoluminescência) e aquecimento da amostra (Figura 2.1). De entre todos esses sinais emitidos pela amostra, os que contribuem de forma relevante para a obtenção da imagem são os electrões secundários e/ou os electrões retrodifundidos.

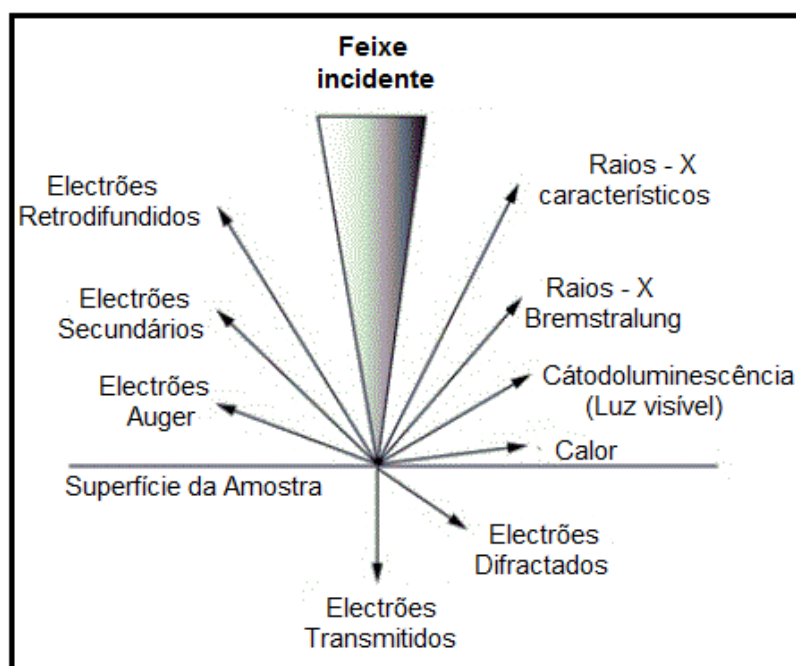


Figura 2.1 – Tipos de electrões e radiações que podem ser emitidos por uma amostra quando submetida a um feixe de electrões.

No SEM, os sinais electrónicos emitidos pela amostra em estudo após incidência de um feixe de electrões são recolhidos por um sistema de detectores presente junto do porta amostras na câmara de vácuo (Figura 2.2 A). Posteriormente esses sinais são amplificados e direccionados para um monitor CRT (tubo de raios catódicos). Para cada ponto da amostra onde incide um feixe de electrões é feita a correspondência a um ponto (pixel) da imagem apresentada no monitor, que é proporcional à intensidade do sinal detectado no volume onde incide o feixe electrónico primário. Assim, a imagem criada resulta de uma sincronização ponto a ponto com a amostra e a sua ampliação corresponde ao rácio entre a dimensão do CRT e a dimensão da porção da amostra percorrida pelo feixe.

A Figura 2.2 B mostra o equipamento de SEM usado na caracterização dos materiais utilizados para desenvolver este trabalho. Os resultados do SEM foram obtidos nas seguintes condições: uma tensão de aceleração de 5 kV, uma abertura de diafragma de 30 μm e uma distância de trabalho de 5.8 mm.

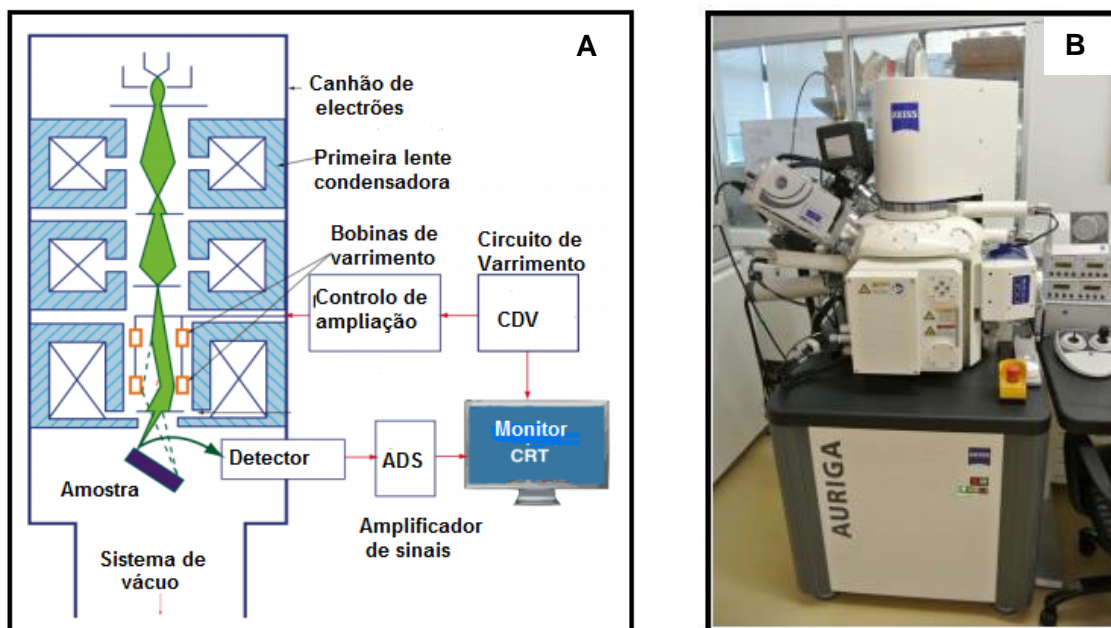


Figura 2.2 – A) Esquema representativo dos principais componentes de um SEM [48] ; B) Equipamento de SEM de Carl Zeiss AURIGA CROSSBEAM SEM-FIB usado na caracterização dos materiais utilizados neste trabalho.

2.1.1 Espectroscopia dispersiva de raios-X

A espectroscopia dispersiva de raios-X (EDS, do inglês *Energy-Dispersive X-ray Spectroscopy*) é uma técnica analítica acoplada ao SEM que permite analisar e identificar os elementos químicos na superfície de materiais. Inicialmente a amostra a analisar é sujeita a um feixe de electrões primários (o feixe do SEM) e, por conseguinte, ocorre a emissão de raios-X característicos dos elementos presentes na amostra que posteriormente passam por uma janela até atingirem o detector de EDS. No detector os fótons de raios-X são convertidos em sinais eléctricos com características específicas de amplitudes e larguras. Após esses sinais eléctricos serem analisados por algoritmos computacionais, a saída é um espectro de intensidade em função da voltagem, que corresponde às energias de raios -X específicas para cada elemento.

Embora todos os elementos químicos cujo número atómico se encontra entre $Z=4$ (Be) e $Z=92$ (U) possam ser identificados por esta técnica, nem todos os equipamentos de EDS estão em condições de fazê-lo. O equipamento utilizado neste trabalho - detector *Oxford INCA x-act* - permite a identificação de elementos com número atómico superior $Z=4$.

2.2 Difracção de raios-X

A técnica de difracção de raios-X (DRX) é muito utilizada na caracterização estrutural de materiais, permitindo a identificação de fases cristalinas, assim como os parâmetros que lhes estão associados.

Os raios-X são produzidos quando um feixe de electrões, proveniente de um cátodo, é acelerado em direcção a um ânodo onde se encontra um alvo. Quando um alvo é atingido por um feixe de electrões altamente energéticos pode ocorrer o fenómeno de ionização – um electrão é removido da orbital mais próxima do núcleo – recompensando, o átomo preenche a orbital mais interna com um electrão de uma orbital mais externa e consequentemente emite raios-X característicos do átomo em questão.

A técnica de difracção de raios-X consiste na incidência de um feixe electromagnético de radiação-X monocromática num material. Desta interação entre a radiação X e a estrutura de um material pode ocorrer reflexão de raios, se esta for em todas as direcções trata-se de um material amorfo, caso a dispersão tome direcções preferenciais, para as quais existe interferência construtiva, encontramos-nos perante um material cristalino.

Para que ocorra a difracção é necessário que o material em estudo seja constituído por planos de átomos periodicamente arrançados e organizados de maneira a formarem um padrão tridimensional (célula unitária) e que o comprimento de onda da radiação incidente seja da mesma ordem de grandeza da distância interatômica presente nesse material.

A lei de Bragg especifica as condições fundamentais para que possa ocorrer a interferência construtiva dos raios-X, isto é, o fenómeno de difracção e pode ser descrita por:

$$2d \times \sin\theta = n_i \times \lambda \quad \text{Eq: 2.1}$$

Para um material cristalino de distância interplanar, d , e para um dado comprimento de onda, λ , as várias ordens de reflexão, n_i , apenas acontecem para valores exactos do ângulo θ , formado entre os planos atômicos e o feixe incidente e difractado (Figura 2.3 A) . Para outros ângulos, a reflexão não existe por causa da interferência destrutiva.

A Figura 2.3 B mostra o equipamento utilizado na realização desta técnica e trata-se de um *X'Pert Pro* da *PANalytical* com uma ampola de cobre. As condições utilizadas para obter as análises de DRX foram: padrão de difracção adquirido para ângulos inicial e final de 10° e 90° (2θ), respectivamente, com um passo de 0,03° (2θ), no método contínuo e operando a 45 kV e 40 mA.

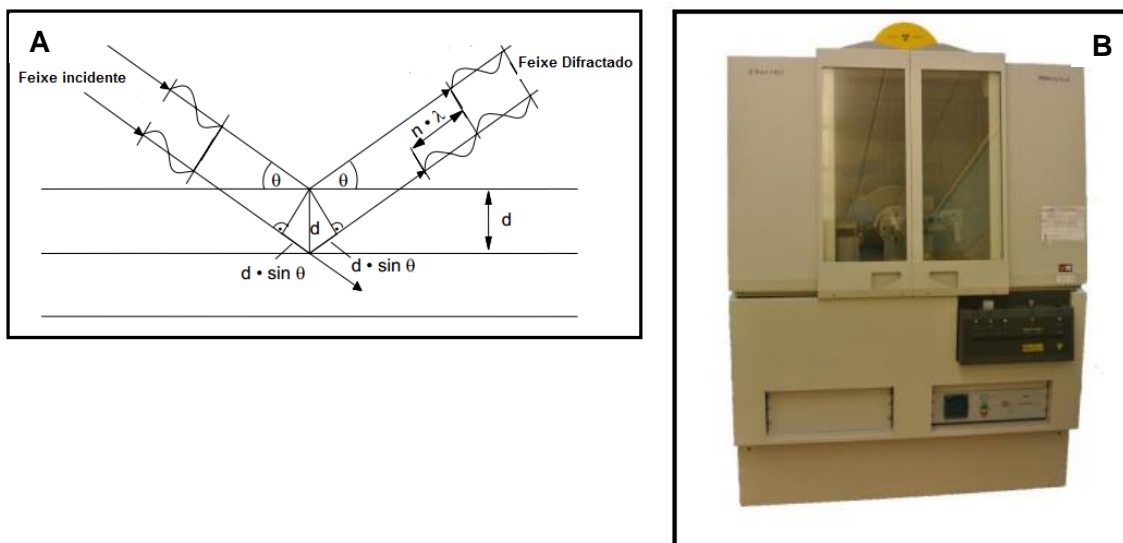


Figura 2.3 - A) Representação geométrica da lei de Bragg. B) Equipamento de DRX, X'Pert Pro da PANalytical utilizado neste trabalho.

2.3 Ângulo de contacto

O ângulo de contacto é uma medida utilizada para caracterizar uma superfície no que diz respeito ao fenómeno de molhabilidade, isto é, a capacidade de uma superfície se molhar quando em contacto com um líquido. A forma adquirida por um volume de um líquido sobre diferentes superfícies também é diferente porque depende das interações entre o líquido e cada uma dessas superfícies em que foi depositado. Portanto, é possível, medir o ângulo de contacto com que uma gota de líquido fica na superfície e com isto caracterizar essa superfície.

O equilíbrio entre as forças de adesão, que permitem o espalhamento da gota do líquido sobre uma superfície sólida e plana, e as forças de coesão do líquido, que permitem a contracção da gota a uma esfera com uma superfície mínima, determina o ângulo de contacto, θ_c . Este equilíbrio é descrito pela equação de Young (Equação 2.2) que relaciona o ângulo de contacto com a tensão de superfície criada por um sistema trifásico: sólido-líquido-gasoso [49].

$$\cos \theta_c = \frac{\gamma_{GS} - \gamma_{LS}}{\gamma_{GL}} \quad \text{Eq: 2.2}$$

Onde γ_{GS} representa a tensão de superfície entre o sólido e o gás, γ_{LS} a tensão entre o líquido e o sólido e γ_{GL} a tensão superficial entre o gás e o líquido. A Figura 2.4 A) mostra a relação entre as grandezas da Equação 2.2.

Existem diversos métodos para determinar o ângulo de contacto, sendo o mais simples e utilizado neste trabalho: o método de *Sessile Drop* (gota sessil). Este método consiste na deposição de uma gota de um líquido sobre a superfície de um substrato sólido colocado num plano horizontal e

recorrendo-se a um *software*, que se encontra ligado ao equipamento da Figura 2.4 B, calcula-se o ângulo de contacto de acordo com a equação de Young apresentada anteriormente.

A medição no que concerne ao ângulo de contacto dos substratos de papel e das amostras preparadas com vista ao estudo da sua hidrofilicidade e hidrofobicidade foi efectuada nas seguintes condições: utilizou-se água destilada para obter as gotas; o volume para cada gota foi de 3 μL e o ângulo foi medido após cada gota estar 10 segundos sobre os substratos de papel e as amostras.

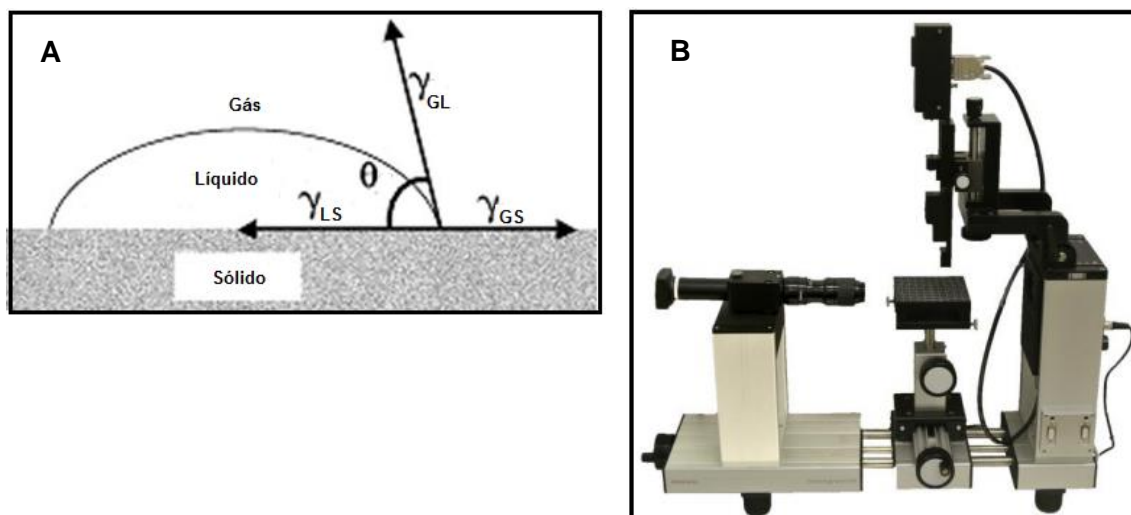


Figura 2.4 – A) Esquema representativo da relação entre o ângulo de contacto e as tensões superficiais; B) Equipamento OCA 20 da Data Physics utilizado na medição do ângulo de contacto dos materiais utilizados neste trabalho.

2.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier modo ATR

A espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é uma importante técnica de caracterização de materiais, sendo muito utilizada na identificação da natureza química dos materiais. A técnica baseia-se na absorção de radiação infravermelha pelas moléculas de um determinado composto que, em consequência, provoca transições nos seus níveis vibracionais. As vibrações moleculares podem ser classificadas em dois tipos, vibração de deformação axial ou estiramento (*Stretching*), que são oscilações radiais das distâncias entre os núcleos, e vibração de deformação angular ou encurvamento (*Bending*), que envolve mudanças dos ângulos entre o plano que contém a ligação e um plano de referência. Para que a absorção no infravermelho aconteça e esta possa figurar-se no espectro do infravermelho, a frequência do campo eléctrico da radiação incidente tem que coincidir com a frequência de vibração dessas moléculas e estas têm de apresentar alterações no seu momento dipolar eléctrico [50].

No espectro electromagnético a região do infravermelho encontra-se entre os números de onda de 13 300 e 10 cm^{-1} . Geralmente esta região é dividida em três sub-regiões: infravermelhos próximos

(13 300 – 4000 cm⁻¹), médios (4000 – 200 cm⁻¹) e longínquos (200 – 10 cm⁻¹). As bandas de absorção devidas às vibrações fundamentais das moléculas aparecem nos infravermelhos médios, sendo por isso essa a região mais importante e mais utilizada em espectroscopia no infravermelho.

O espectro de FTIR é obtido medindo a quantidade de energia absorvida pela amostra a cada comprimento de onda, frequência ou número de onda. A partir desta informação obtém-se um espectro disposto num gráfico em que o eixo das ordenadas (y) representa unidades de absorvância ou transmitância em função de número de onda, eixo das abcissas (x).

A transmitância (T_r) é definida como rácio entre a intensidade transmitida (I_t) por uma amostra e a intensidade da radiação incidente (I_0), conforme é mostrado na Figura 2.5.

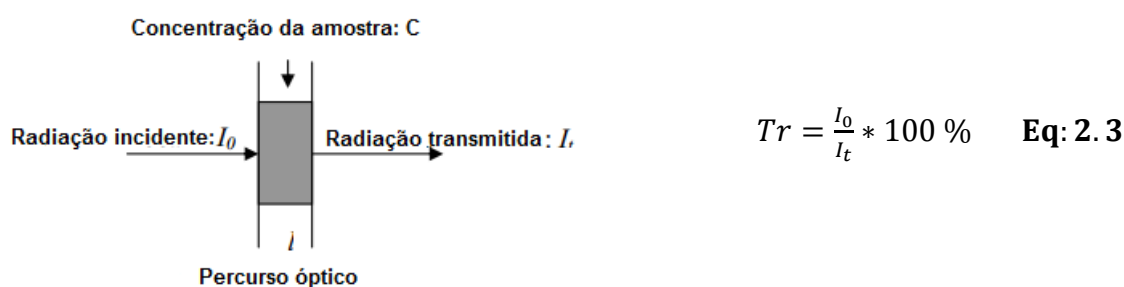


Figura 2.5 – Ilustração da definição da transmitância e absorvância.

O espectro FT-IR de absorvância segue a lei de Lambert-Beer que relaciona concentração (C), absorvância (A_λ) e absorvidade molar (ϵ_λ) conforme a Equação 2.4. Este espectro encontra-se, também, relacionado com a transmitância segundo a Equação 2.5.

$$A_\lambda = l * \epsilon_\lambda * C \quad \text{Eq: 2.4}$$

$$A = -\log_{10} (T_r) \quad \text{Eq: 2.5}$$

Para obter um espectro de FITR de amostras com características específicas, por exemplo por serem opacas ou em soluções, usam-se técnicas de reflectância. Uma dessas técnicas é o módulo de reflectância total atenuada (ATR, do inglês *Attenuated Total Reflectance*). Neste tipo de espectroscopia a radiação infravermelha é direcionada para um cristal opticamente denso com alto índice de refração – tipicamente entre 2,30 e 4,01 – a um determinado ângulo de incidência da radiação. Perante esta situação, ocorre o fenómeno de reflexão total onde a radiação incidente ultrapassa a interface entre o cristal e o material em estudo, e se propaga ao longo do comprimento do cristal até sair na extremidade oposta. Se o feixe de infravermelho penetrar o material e for absorvido, este será detectado (Figura 2.6 A)[51].

A Figura 2.6 B mostra o equipamento de FTIR com acessório ATR de cristal de diamante utilizado neste trabalho para obter espectros de infravermelhos das amostras de papel e poli-3-hidroxibutirato [P(3HB)]. Estes espectros foram obtidos numa região espectral de 500 a 4500 cm⁻¹, com resolução de 4 cm⁻¹ e 64 scans.



Figura 2.6– A) Representação de um sistema de reflectância total atenuada (ATR) [51]. B) Equipamento de FTIR *Nicolet 6700 FTIR da Thermo ELECTRON CORPORATION* com acessório ATR de cristal de diamante.

2.5 Análises Térmicas

O termo análise térmica (TA, *Thermal Analysis*) consiste num conjunto de técnicas experimentais de análises que estuda o comportamento de amostras em função da temperatura. Algumas destas técnicas que estão abrangidas e englobadas na análise térmica são: Calorimetria diferencial de varrimento (DSC, *Diferencial Scanning Calorimetry*), análise térmica diferencial (DTA, *Differential Thermal Analysis*), análise termogravimétrica (TG, *Thermogravimetry*) e análise termomecânica (TMA, *Thermomechanical Analysis*). A capacidade dessas técnicas em caracterizar quantitativa e qualitativamente um número bastante considerável de materiais num intervalo de temperaturas significativo, faz com que sejam aceites como técnicas analíticas importantíssimas em diversas áreas de estudos e aplicações [52].

Estas técnicas são muito usadas no estudo de materiais poliméricos. Neste trabalho utilizou-se a análise termogravimétrica e a calorimetria diferencial de varrimento para obter informação de temperaturas de transição e decomposições características de materiais poliméricos como P(3HB) e substratos de celulose.

2.5.1 Análise Termogravimétrica (TG)

A análise termogravimétrica é uma técnica que fornece informação da variação da massa de amostras à medida que a temperatura aumenta e pode ser representada em função da temperatura ou do tempo (modo isotérmico). Embora algumas transições térmicas tais como fusão, cristalização ou transição vítrea não apresentem alterações na massa de uma amostra, no entanto, processos físicos e/ou químicos como a absorção, sublimação, evaporação, oxidação, redução e decomposição de materiais provocam mudanças na massa de uma amostra. Deste modo, a TG pode ser utilizada para determinar a estabilidade térmica e decomposição de diversos materiais.

2.5.2 Calorimetria Diferencial de Varrimento (DCS)

A calorimetria diferencial de varrimento é uma técnica de análise térmica que permite obter informação acerca do fluxo de energia calorífica associado a transições de uma amostra em função da temperatura. Na DSC uma amostra e uma substância de referência são submetidas a um programa de aquecimento ou arrefecimento muito controlado e em simultâneo regista-se a diferença no fornecimento de energia calorífica entre ambas em função da temperatura. Essas variações entálpicas medidas permitem identificar e quantificar as transições que ocorrem na amostra dependendo do tipo de processos envolvidos, endotérmicos ou exotérmicos. Por exemplo, transições térmicas cujos processos endotérmicos (absorção de energia calorífica) estão envolvidos são: temperatura de fusão, evaporação transição vítrea. Quanto às transições que envolvem processos exotérmicos (libertação de energia calorífica) podem ser: cristalização e oxidação. Ainda podem ser obtidas outras informações referentes a alterações das propriedades físicas e/ou químicas, como o grau de cristalinidade de um polímero, cinética de reacções e diagrama de fases [53].

O grau de cristalinidade, $X_c(\%)$, de amostras pode ser determinado através da medida da entalpia de fusão cristalina (ΔH_f) obtida por DSC conforme a equação 2.6 [54].

$$X_c(\%) = \frac{\Delta H_f}{\Delta H_0} * 100 \quad \text{Eq: 2.6}$$

Onde ΔH_0 corresponde a entalpia de fusão de uma amostra 100% cristalina em J/g.

O equipamento *STA 449 F3 Jupiter* da Figura 2.7 foi utilizado para a realização das análises térmicas dos substratos de papel, das amostras impregnadas e do filme de P(3HB). Este equipamento permite obter as análises de DSC e TG em simultâneo. As análises realizaram-se nas seguintes condições: as amostras foram colocadas num cadinho de alumínio sem tampa, em atmosfera de nitrogénio, com uma taxa de aquecimento de 5 K/min num intervalo de temperatura de 20-550 °C.



Figura 2.7 - Equipamento *STA 449 F3 Jupiter* da NETZSCH utilizado neste trabalho

3 Materiais e Métodos Experimentais

3.1 Materiais hidrófilos

O principal suporte utilizado para o desenvolvimento deste trabalho foi o papel, deste modo foi fundamental e imprescindível o estudo de diferentes tipos de papel com vista a observar, caracterizar e escolher aquele que melhor se potencia e adequa aos resultados pretendidos:

- i. Papel de cromatografia Whatman nº1 (Whatman internacional, Florham Park, Nj, USA);
- ii. Papel filtro de laboratório (Rundfilter MN 615, Filter paper for qualitative analyses. MACHEREY-NAGEL, GMBH & Co.KG, Germany);

Para se poder conhecer as diferenças existentes entre os dois substratos de papel acima referidos é necessário o estudo e a determinação de algumas características ou propriedades macroscópicas que os caracterizam. Desde modo, na tabela que se segue encontram-se descritas estas propriedades macroscópicas.

Tabela 3.1 - Propriedades macroscópicas dos substratos hidrófilos utilizados neste trabalho [46], [55].

Substrato de papel	Gramagem (g/m ²)	Espessura (μm)	Densidade (kg/m ³)	Porosidade (%)	Poros médio (μm)
Whatman nº1	88	180	489	68,2	11
Filtro de Laboratório	70	160	438	71,6	5-10

As propriedades como a gramagem e a espessura foram obtidas a partir da referência fornecida no catálogo do próprio fornecedor do substrato de papel em questão, a densidade foi calculada como a razão entre a gramagem e a espessura e por fim a porosidade foi estimada a partir da Equação 3.1 que relaciona a densidade do papel e a densidade das fibras de celulose presentes no papel ($\rho_{fibra} = 1540 \text{ kg/m}^3$)[46]

$$\text{Porosidade (\%)} = \left(1 - \frac{\rho_{papel}}{\rho_{fibras}} \right) \times 100 \quad \text{Eq: 3.1}$$

O conhecimento destas propriedades macroscópicas é importante para este trabalho uma vez que permite uma escolha adequada do tipo de substrato a utilizar no desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos. É expectável que quanto mais poroso for um substrato maior quantidade de solução de P(3HB) consiga absorver na sua rede fibrosa. Embora o papel filtro de laboratório seja ligeiramente

mais poroso que o papel Whatman nº1, uma diferença de 3,4 % de porosidade entre os substratos, o tamanho médio de um poro do papel filtro de laboratório é inferior ao do papel Whatman nº1, conforme a Tabela 3.1.

Posteriormente os resultados obtidos com as técnicas de caracterização no capítulo 4 mais estas propriedades macroscópicas estudadas, auxiliar-nos-ão na escolha do substrato que melhor se enquadra nos objectivos deste trabalho.

3.2 Material hidrófobo

Para controlar o movimento de um líquido através de canais desde a zona de depósito até zonas de testes predefinidas e, por conseguinte, o seu confinamento a essas zonas de testes, torna-se necessário criar barreiras hidrófobas resistentes que limitem esses canais e essas zonas. Neste trabalho, essas barreiras foram projectadas e implementadas pela primeira vez recorrendo a uma solução que contém o polímero [P(3HB)]. A Figura 3.1 mostra o P(3HB) na forma recebida.



Figura 3.1 - Forma recebida do biopolímero P(3HB).

3.3 Preparação do papel hidrófobo

O primeiro objectivo deste trabalho foi a preparação do papel hidrófobo. Para isso recortaram-se amostras de papel com dimensões de 6 x 6 cm² que foram submersas em clorofórmio durante 6 horas para que eventuais impurezas e alguns aditivos solúveis neste solvente orgânico fossem removidos. Preparou-se uma solução em clorofórmio que contém 1% (m/m) do polímero P(3HB) a 58 °C e a um tempo adequado de modo a garantir a dissolução total do polímero. As amostras do papel anteriormente preparadas em clorofórmio foram imersas, por um período de 8 horas, na solução de P(3HB) de modo a que a solução se pudesse difundir na matriz das fibras celulósicas, e por conseguinte, alterar as propriedades das amostras do papel de hidrófilas para hidrófobas. Posteriormente, as amostras foram suspensas na *Hotte* para secarem à temperatura ambiente e à pressão atmosférica. A Figura 3.2 ilustra as etapas adoptadas na preparação do papel hidrófobo.



Figura 3.2 - Representação das etapas realizadas na preparação do papel hidrófobo.

Os reagentes e os materiais utilizados na preparação do papel hidrófobo foram:

Reagentes: Biopolímero P(3HB) - Fornecido pela equipa de investigação do DQ/FCT, Clorofórmio (CHCl_3) - Sigma-Aldrich (p. 99.0-99,4 %).

Materiais: Substratos de papel Whatman nº1, Filtro de Laboratório, Vasilhas – 14 x 14 cm^2 , Balão Volumétrico de 250 mL, barras magnéticas.

Equipamentos: Placa térmica Heidolph MR Hei-Tec, Balança analítica OHAUS, Hotte.

3.4 Padronização de canais 2D

Após preparação do papel hidrófobo, o passo subsequente foi a padronização dos canais, ou seja, a submissão do papel preparado ao tratamento com radiação UV e ozono para a criação de zona de depósito, canais de condução de fluídos e zonas de testes.

Os canais hidrófilos, que os fluidos percorrem até zonas predestinadas, foram projectados e desenvolvidos com recurso às máscaras de fita adesiva de Kapton (Figura 3.4 A) e tratamento com radiação UV e ozono (Figura 3.4 C).

A geometria e os padrões das máscaras que definem os canais nas amostras hidrófobas foram dimensionadas e desenhadas recorrendo a um *software CAD-Adobe Illustrator*. As características ocas desejáveis nas máscaras foram alcançadas com um equipamento de corte a laser VLS 3.50 (*Universal Laser Systems, Scottsdale, Arizona, USA*). O material utilizado na produção das máscaras foi a fita adesiva de kapton (*KPT-2485, pro-POWER*). Verificou-se que o Kapton evita exposição à radiação UV.

Ao colocar as máscaras sobre o papel hidrófobo preparado e submetendo-o à exposição da radiação UV e ozono, as características ocas presentes nas máscaras expõem parte da amostra sob o efeito de luz/ozono e, conseqüentemente, registam-se mudanças nas propriedades físicas e químicas do papel hidrófobo que levam a um aumento da molhabilidade nessas regiões - *wettability* - capacidade de um material se molhar quando está em contacto com um líquido (Figura 3.4 D).

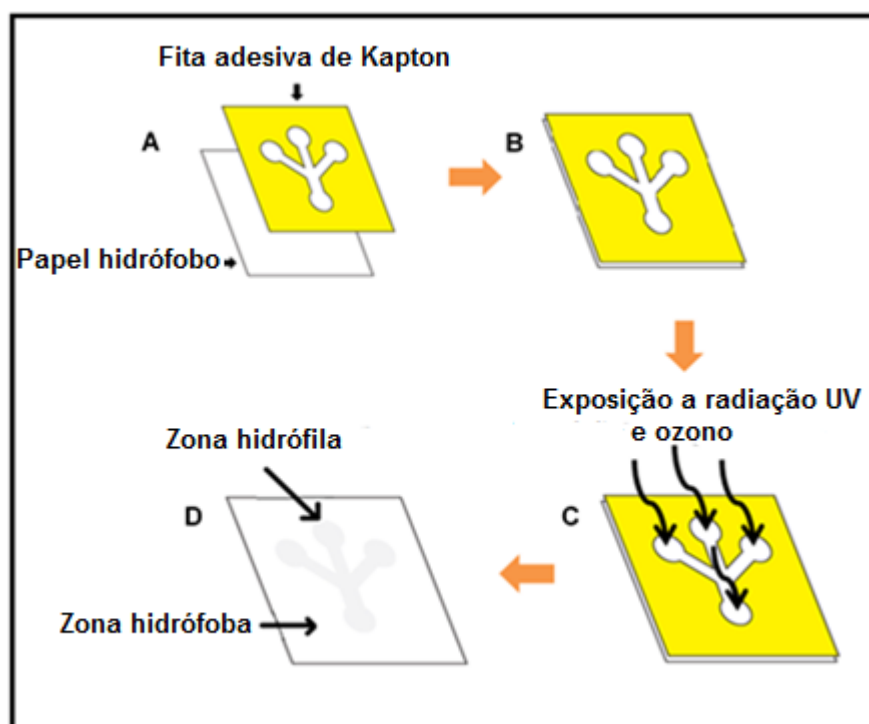


Figura 3.3 - Representação das etapas realizadas na padronização e criação de canais 2D: A) preparação do papel hidrófobo e da máscara de fita de kapton; B) Sobreposição da máscara de kapton com papel hidrófobo; C) Exposição de B) à radiação UV e ozono e C) resultado da criação de zonas hidrófilas-hidrófobas.

3.4.1 Tratamento com radiação UV e Ozono (UV-O₃)

O tratamento com UV-O₃ é uma técnica que tem sido muito usada em nanotecnologia para tratamento de substratos. É a técnica ideal para remover contaminantes orgânicos sem necessidade de se recorrer a solventes, que podem deixar vestígios. Uma lâmpada, geralmente de descarga de mercúrio, é usada para gerar radiação ultravioleta que, na presença de oxigênio, produz moléculas de ozono. A combinação do UV-O₃ leva a destruição destes contaminantes orgânicos [56], [57].

A Figura 3.3 mostra o equipamento *novascan PSD-UV* (Novascan Technologies, inc. USA) utilizado para efectuar o tratamento e a criação de canais sobre a superfície dos substratos de papel impregnados com P(3HB).



Figura 3.4 – Equipamento *novascan PSD-UV* de Novascan Technologies Designs usado neste trabalho

3.5 Dispositivo para medir a concentração de glucose em soluções aquosas

O dispositivo para medir a concentração de glucose em soluções aquosas segundo a tecnologia *Lab-on-Paper*, criação de contraste hidrófilo-hidrófobo no papel, foi concebido conforme ilustra a Figura 3.5.

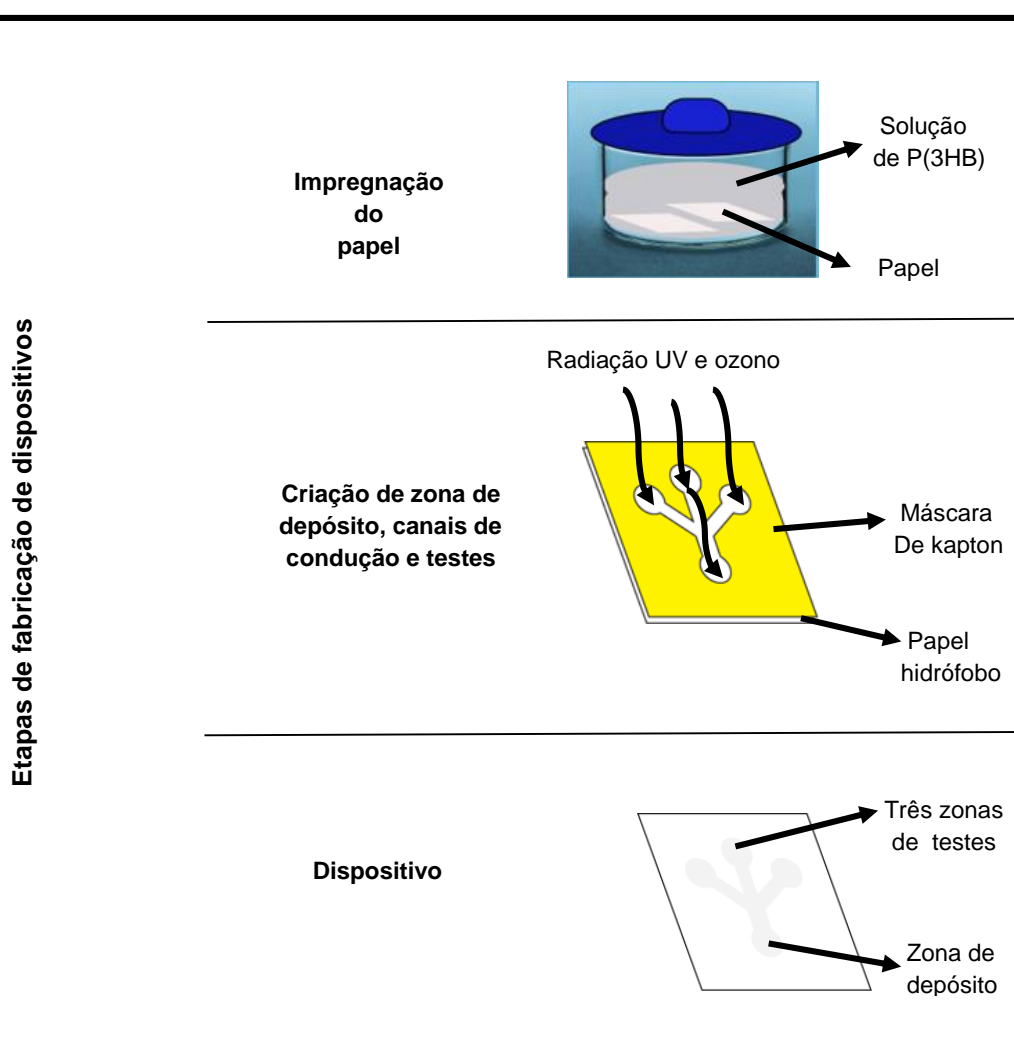


Figura 3.5 - Representação por etapas do processo de fabricação de dispositivos para medir concentrações de glucose em soluções aquosas

A Figura 3.6 mostra a disposição dos indicadores de oxidação/redução no dispositivo de glucose. Em cada zona de testes foi depositado 2 μL de cada indicador conforme está indicado na Figura 3.6.

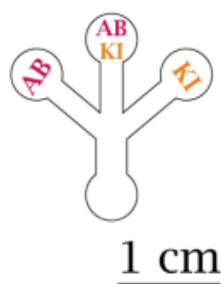


Figura 3.6 - Disposição dos indicadores de oxidação-redução no biossensor de glucose [46].

O indicador AB corresponde a uma mistura de rácio molar 1:2 de 4-aminoantipirina com ácido 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfónico de sódio cujas concentrações são 4 mM e 8 mM, respectivamente.

O indicador KI, de concentração 0,5 M, foi assim denominado uma vez que corresponde à fórmula química que o compõe, iodeto de potássio.

De seguida, após os indicadores terem secado, foi depositado 2 μL de solução de enzimas nas três áreas que compõem a zona de testes do biossensor. Esta solução enzimática foi preparada com glucose oxidase (645 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$), peroxidase (339 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) e 0,3 M de trehalose, em solução tampão de pH 6,0. A trehalose, com função de estabilizador proteico, foi adicionada à solução de enzimas para reduzir a sua desnaturação durante o armazenamento [45], [46].

Finalmente, para testar os dispositivos desenvolvidos, foram preparadas 11 soluções padrão de glucose com concentrações molares diversas conforme está descrito na Tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Soluções padrão de glucose preparadas para testes colorimétricos.

Nº	Concentração Glucose (mM)	Nº	Concentração Glucose (mM)	Nº	Concentração Glucose (mM)
1	0,5	5	7,0	9	40
2	1,0	6	10	10	50
3	3,0	7	20	11	100
4	5,0	8	30	-	-

As 11 soluções padrão foram utilizadas para calibrar a resposta do biossensor a diferentes concentrações de glucose. O volume da solução padrão utilizado na zona de depósito foi determinado como o volume mínimo capaz de preencher totalmente a área delimitada pelas barreiras hidrófobas de P(3HB). Os resultados obtidos foram analisados visualmente e digitalizados para serem tratados com o *software* de análise de imagem *imageJ*.

Em seguida apresentam-se os reagentes, os materiais, os equipamentos e os *softwares* utilizados nesta parte do trabalho:

Reagentes: 4-Aminoantipirina ($C_{11}H_{13}N_3O$); 3,5-dicloro-2-hidroxibenzenosulfonato de sódio [$Cl_2C_6H_2(OH)SO_3Na$]; Iodeto de potássio (KI); Glucose Oxidase de *Aspergillus niger*, $215U.mg^{-1}$; Peroxidase de *Horseradish*, $52U.mg^{-1}$; D-(+)-Trehalose desidratada de *Saccharomyces cerevisiae* p.≥99% ($C_{12}H_{22}O_{11} \cdot 2H_2O$) e D- (+)-glucose p.≥99,5% ($C_6H_{12}O_6$) – estes reagentes foram obtidos na Sigma-Aldrich Co, USA; Solução tampão de pH 6,0 (Carl Roth GmbH + Co.KG); P(3HB) e Água destilada (Milipore).

Materiais: Papel Whatman nº1, Eppendorfs.

Equipamentos: Scanner Canon (PIXMA MG5200), Micropipetas, *novascan* PSD-UV.

Softwares: ImageJ (*National Institutes of Health, Maryland, U.S*) – utilizado para processar as imagens digitalizadas dos biossensores; OriginPro 8.5 (*OriginLab, Northampton, U.K*) – utilizado para obter as curvas de calibração destes biossensores e respectivas equações matemáticas.

4 Apresentação e Discussão de Resultados

Neste capítulo do trabalho são apresentados os resultados obtidos através dos métodos de caracterização dos materiais descritos no segundo capítulo bem como os resultados obtidos através das experiências laboratoriais. Algumas considerações e conclusões pertinentes também vão sendo apresentadas sempre que se achar necessário.

4.1 Caraterização dos substratos de papel

Antes da realização do estudo das superfícies dos substratos de papel Whatman nº1 e filtro de laboratório, modificadas pela impregnação de P(3HB) nas suas redes fibrosas, procedeu-se às análises e caracterizações das superfícies destes substratos sem modificações, utilizando os métodos experimentais subseqüentes.

4.1.1 Microscopia electrónica de varrimento

A microscopia electrónica de varrimento foi utilizada para fornecer informação relativa à morfologia dos substratos de papel - Whatman nº1 e filtro de laboratório.

A Figura 4.1 A) e B) mostra as imagens de SEM respeitantes ao papel Whatman nº1 e papel filtro de laboratório, respectivamente. De acordo com as imagens obtidas por SEM dos dois substratos de papel é notória a malha tridimensional das fibras de celulose presente em cada um, facto que já era previsto visualizar numa caracterização morfológica da superfície do papel. No que toca à disposição das suas fibras, a orientação destas depende das acções mecânicas às quais são submetidas. Nos dois substratos de papel é possível observar que ambos apresentam porosidades significativas (espaços entre as fibras) e ausência de partículas ou minerais nas superfícies das fibras, características fundamentais de um papel de cromatografia (Whatman nº1) e filtro de laboratório. As fibras que constituem os dois substratos de papel apresentam geometrias distintas: as do papel filtro de laboratório são mais achatadas e colapsadas enquanto que as do papel Whatman nº1 apresentam geometria cilíndrica, o que o torna mais espesso do que o papel filtro de laboratório.

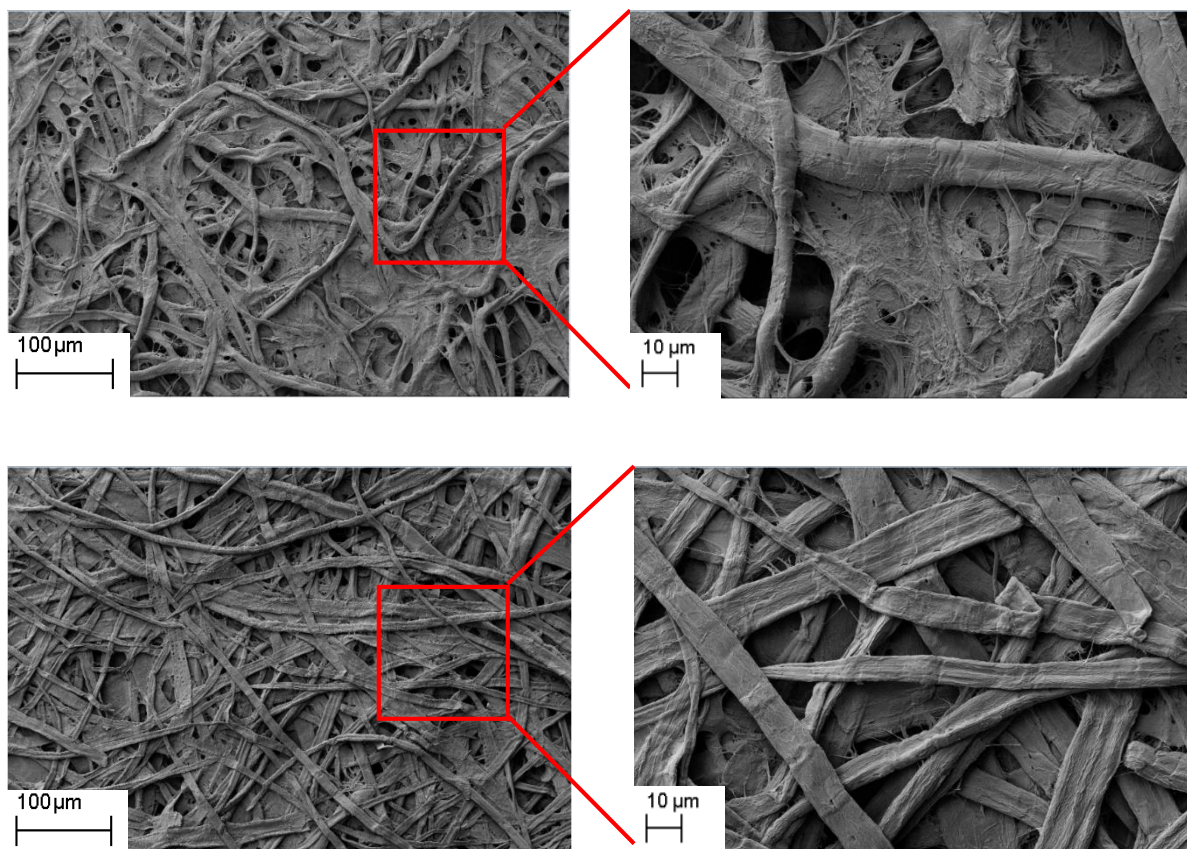


Figura 4.1 – Imagens obtidas por SEM: A) papel Whatman nº1; B) papel filtro de laboratório

4.1.2 Difracção de raios-X

O perfil de difracção para os substratos de papel em estudo está representado nos difractogramas da Figura 4.2. Para o papel Whatman nº1 observou-se os seguintes picos de difracção cujos valores de 2θ estão em: $14,9^\circ$, $16,6^\circ$, $22,8^\circ$ e $33,4^\circ$ e correspondem aos índices de Miller (101), (10-1), (002) e (040), respectivamente. Quando num substrato de papel o conteúdo da componente celulósica é elevado verifica-se a volta de $2\theta = 16^\circ$ dois picos distintos de difracção, como no caso do papel Whatman nº1. Todavia quando o substrato de papel contém elevadas quantidades de materiais amorfos, como a lenhina e a hemicelulose, ou celulose amorfa, ocorre a fusão destes dois picos e forma um único pico largo como o da difractograma do papel filtro de laboratório (Figura 4.2 B) [58].

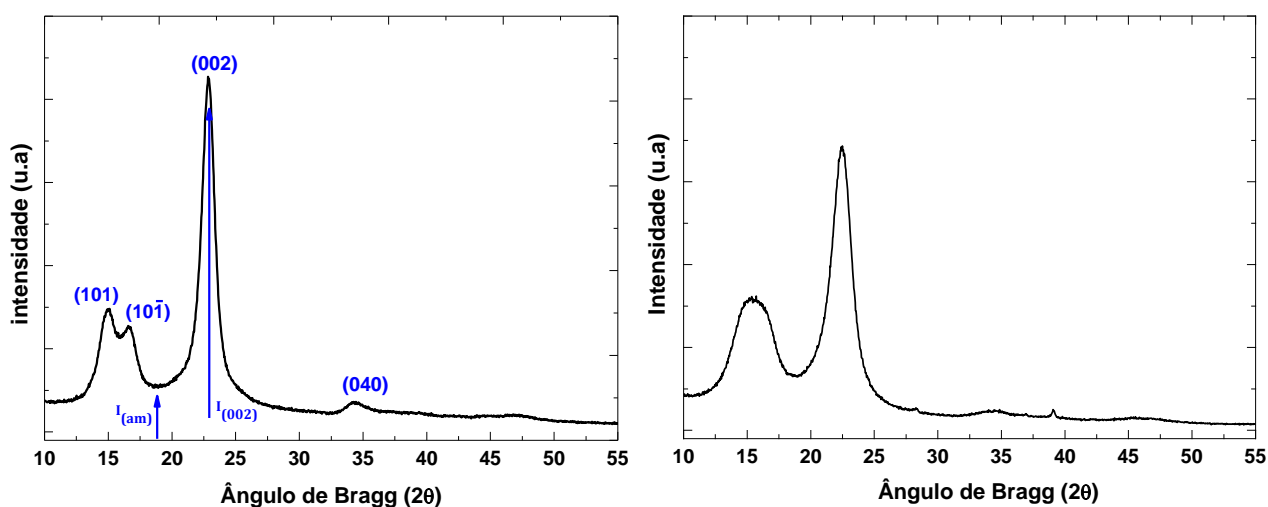


Figura 4.2– Difractograma de: A) Papel Whatman n°1 e B) Papel filtro Laboratório

Tanto no substrato de papel Whatman n°1 quanto no papel filtro de laboratório foram obtidos e visualizados picos característicos da estrutura cristalina de celulose tipo I, e não foram identificados picos que não caracterizassem a estrutura da celulose. Estes picos e índices de Miller estão de acordo com os referidos na literatura [59]–[61].

Para o cálculo do índice de cristalinidade (I_c) dos substratos de papel estudados foi utilizado o método empírico de Segal *et al* [62]:

$$I_c = \frac{I_{(002)} - I_{(am)}}{I_{(002)}} \times 100\% \quad \text{Eq: 2.7}$$

Onde $I_{(002)}$ representa a intensidade máxima de índice de Miller (002) da estrutura cristalina da celulose e $I_{(am)}$ representa a intensidade de difracção correspondente à componente amorfa do material que se situa a um ângulo $2\theta=18^\circ$ [58]. Deste modo, foram obtidos os seguintes índices de cristalinidades: 87,1% para o papel Whatman n°1 e 79,0% para o papel filtro de laboratório. Estes valores reforçam o que foi dito anteriormente em relação ao conteúdo de celulose presente nos dois substratos de papel em estudo.

4.1.3 Ângulo de contacto

Como foi mencionado anteriormente, a medição do ângulo de contacto permite-nos caracterizar estes materiais quanto ao fenómeno de molhabilidade. De acordo com a Figura 4.3 dentre os dois substratos de papel utilizado o que apresentou um ângulo de contacto menor foi o papel Whatman n° 1 ($13,6 \pm 1,0^\circ$). Todavia, ambos os substratos utilizados demonstraram ter afinidade com a água, sendo por isso hidrófilos. O ângulo de contacto do papel filtro laboratório foi de $16,0 \pm 0,8^\circ$.

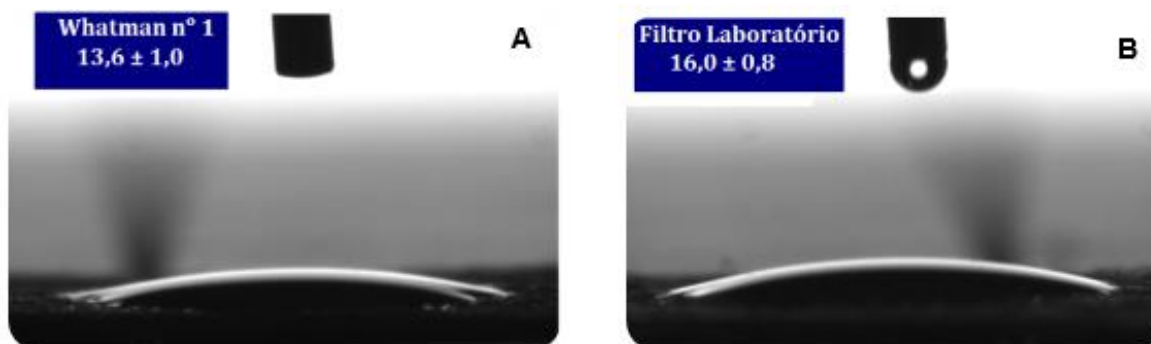


Figura 4.3– Ângulos de contacto referentes aos substratos Whatman nº 1 (A) e filtro Laboratório (B).

4.1.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier modo ATR

A análise de um espectro de FTIR-ATR permite obter facilmente e com rapidez informação relativa à composição química dos substratos de papel alvo de estudo (Whatman nº1 e filtro laboratório), permitindo identificar as ligações químicas e os grupos funcionais presentes nos mesmos.

Pela observação dos dois espectros representados na Figura 4.4 é notória a semelhança existente entre ambos, devido aos seus principais constituintes, neste caso, as fibras de celulose. Ambos os espectros apresentam bandas nas mesmas posições, deste modo não se vão particularizar as suas análises. Na primeira região, compreendida entre os números de onda de 4000 e 2500 cm^{-1} , é possível identificar dois picos distintos. O primeiro pico, por volta de 3303,9 cm^{-1} , corresponde ao estiramento das ligações covalentes simples do grupo hidrogénio-oxigénio enquanto o segundo, em 2900,1 cm^{-1} , diz respeito ao estiramento das ligações covalentes simples do grupo carbono-hidrogénio. Nessa região há uma predominância do estiramento de ligações que envolvem o átomo de hidrogénio. O peso do átomo de hidrogénio é de uma ordem de grandeza inferior relativamente aos outros átomos que constituem uma molécula orgânica e as suas ligações precisam de mais energia para serem desestabilizadas por essas razões o átomo de hidrogénio vibra a frequências mais elevadas. As regiões subsequentes estão compreendidas entre os números de onda 2500 - 2000 cm^{-1} e 1900 – 1500 cm^{-1} e referem-se, respectivamente, à região de vibrações das ligações covalentes triplas e à região de vibrações das ligações covalentes duplas. Como o previsto não se identifica a presença de bandas nestas regiões dos espectros obtidos. Finalmente a região referente às ligações covalentes simples - números de ondas inferiores a 1500 cm^{-1} – que também é conhecida como a impressão digital dos compostos. Esta região é muito importante para determinar e conhecer a estrutura dos compostos. O pico localizado em 1640,1 cm^{-1} está provavelmente associado à absorção de água na estrutura cristalina da celulose [63].

Na zona designada de impressão digital é possível identificar diversas bandas de absorção: a banda de 1442,3 e 1288,5 cm^{-1} é característica da deformação das ligações do grupo metileno ($-\text{CH}_2$);

a banda de absorção com dois picos em 1162, 4 e 1108, 4 cm^{-1} é consequência da deformação assimétrica e simétrica da ligação glicosídica (-C-O-C); a banda cujo número de onda está na posição 1028, 0 cm^{-1} é relativa à vibração do anel de carbono da glucose, representando o estiramento da ligação (-C-O) e por fim, o pico situado em 894, 9 cm^{-1} é provocado pelo estiramento do anel D-glucose e também é característico da ligação β - ligação que se estabelece entre os anéis D-glucose.

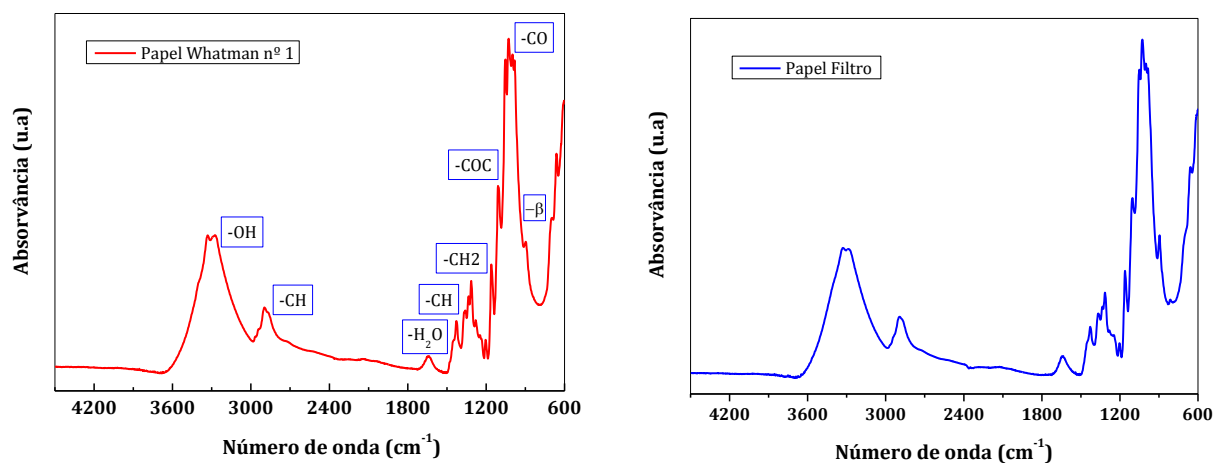


Figura 4.4 - Espectros de FTIR-ATR dos substratos de papel Whatman nº1 e filtro de laboratório.

Existem agentes como a luz, a temperatura, a humidade relativa ou radiações, que provocam mudanças e alterações na estrutura molecular e nas propriedades físicas e químicas de um determinado material através de um processo denominado de degradação. Com isto, podem ocorrer cisões de ligações da cadeia principal da macromolécula em estudo, as quais levam à diminuição da massa molecular da mesma.

Os substratos de papel foram submetidos a diferentes tempos de tratamento com UV- O_3 com o intuito de avaliar o impacto que este teria sobre estes materiais. Posteriormente, realizou-se análise em FTIR-ATR para averiguar o comportamento das bandas de absorvância existentes nestes materiais após o tratamento com UV- O_3 .

Os espectros da Figura 4.5 são respeitantes aos substratos de papel Whatman nº1 e filtro de laboratório, antes e após terem sido tratados com UV- O_3 . Para cada substrato utilizou-se os mesmos tempos de tratamento - 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Ao analisarmos os espectros da Figura 4.5 não se verificam mudanças ou alterações significativas nas bandas de absorção dos espectros sem tratamentos e dos tratados a diferentes tempos. Como exemplo, referenciamos a banda localizada em 3303,9 cm^{-1} que corresponde ao estiramento do grupo hidroxilo (-OH).

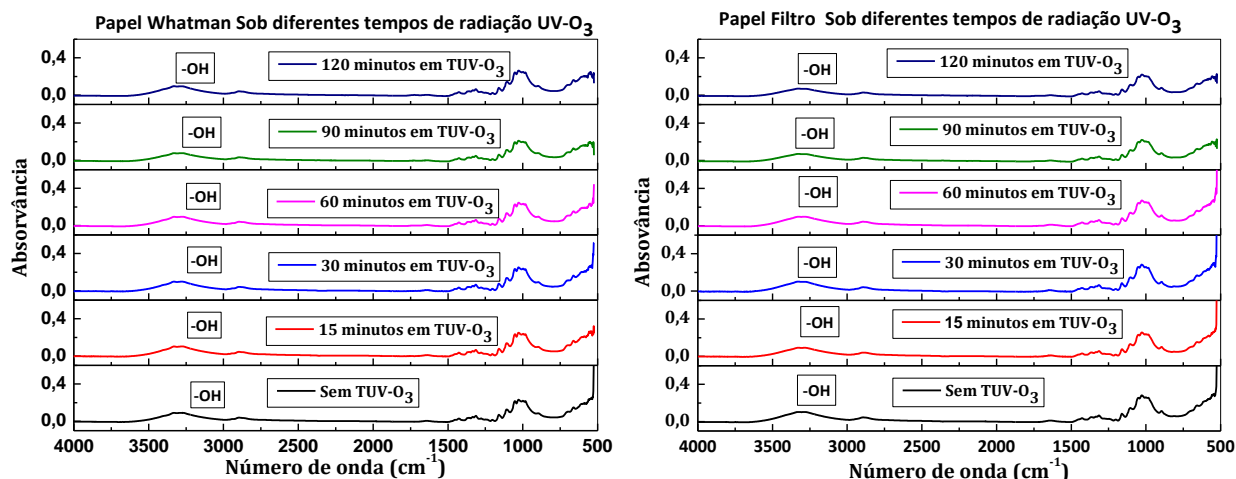


Figura 4.5 - Espectros de FTIR-ATR do papel Whatman nº1 e papel filtro de laboratório expostos a diferentes tempos de UV-O₃.

4.1.5 Análises térmicas

Os substratos de papel foram submetidos a aquecimento à temperatura no intervalo de 0 °C a 550 °C com intuito de observar o comportamento destes materiais em função da temperatura. O estudo térmico destes materiais, que integram o desenvolvimento de dispositivos microfluídicos, é relevante na medida que permite obter informações acerca das condições críticas de operabilidade, transporte e armazenamento destes dispositivos. As curvas de TG e DSC dos substratos de papel Whatman nº1 e filtro de laboratório estão representadas na Figura 4.6.

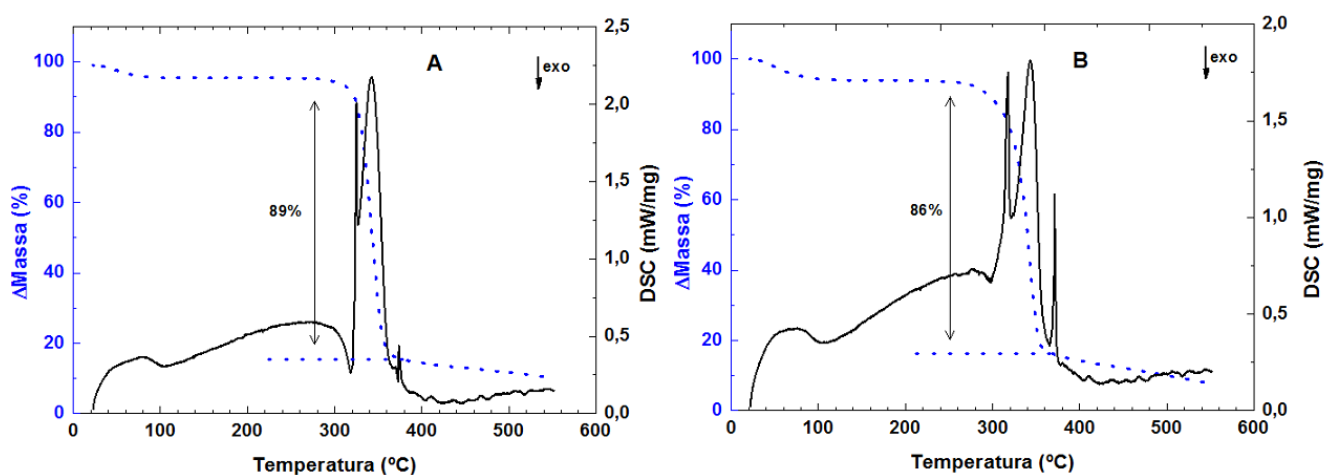


Figura 4.6 – A) Curvas de TG (traço contínuo) e DSC (traço cheio) do papel Whatman nº1; B) Curvas de TG (traço contínuo) e DSC (traço cheio) do papel filtro de laboratório.

Para ambos os substratos representados, verifica-se a ocorrência de duas perdas de massas no intervalo caracterizado. A primeira perda de massa dá-se aproximadamente aos 100 °C, à qual está associado a um pico endotérmico no DSC, e corresponde à evaporação da molécula de água. Desta transformação, a perda de massa resultante para o papel Whatman nº1 foi de ~2% e para o papel filtro de laboratório foi de 6 %. A segunda e a maior perda de massa verificada para ambos os substratos dá-se no intervalo de temperaturas entre os 320 °C e 380 °C, correspondendo no DSC a três picos endotérmicos, que traduz a degradação da celulose, componente maioritária dos substratos. A perda resultante desta transformação foi de 89% para o papel Whatman nº1 e 86% para o papel filtro de laboratório.

Uma vez verificada através desta análise térmica que o intervalo de degradação da celulose se dá entre os 320 °C e 380 °C, permite concluir que no caso de estes substratos serem armazenados, transportados e utilizados na fabricação de dispositivos microfluídicos, não sofrem transformações quando submetidos a temperaturas inferiores a 320 °C.

A partir desta fase do trabalho, o estudo para o desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos será realizado com o substrato de papel Whatman nº1. São várias as razões que levaram a utilizar este substrato de papel:

i) no estudo das propriedades macroscópicas dos substratos de papel, tal como é referido no capítulo 3, o papel Whatman nº1, embora seja ligeiramente menos poroso que o papel filtro de laboratório (menos 3,4% de porosidade), apresenta um tamanho médio de poro maior do que o de filtro de laboratório;

ii) as técnicas de caracterização mostraram que o papel Whatman nº1 é constituído essencialmente por fibras de celulose não modificadas e não apresenta aditivos na sua estrutura. Quanto ao papel filtro de laboratório através da análise por DRX observou-se um pico que caracteriza elevadas quantidades de materiais amorfos, como a lenhina e a hemicelulose, ou celulose amorfa;

iii) o índice de cristalinidade calculado para o papel filtro de laboratório (79,0%) e para o papel Whatman nº1 (87,1%) a partir dos picos de difracção no DRX demonstrou também existir mais conteúdo de celulose no papel Whatman nº1 do que no papel filtro de laboratório;

iv) recorrendo a medidas de ângulo de contacto com água, observou-se que o papel Whatman nº1 apresenta boas propriedades hidrófilas - com ângulo de contacto $13,6 \pm 1,0^\circ$ inferior ao do papel filtro de laboratório, $16,0 \pm 0,8^\circ$ - o que permite uma boa absorção e condução de soluções aquosas por capilaridade;

v) o papel de cromatografia Whatman nº1 tem sido um substrato de papel utilizado em inúmeros estudos de microfluídica em papel encontrados na literatura [64]–[68];

4.2 Caracterização do Filme P(3HB)

No decurso deste trabalho foram utilizados dois biopolímeros distintos. Numa primeira fase, fez-se o estudo do desenvolvimento dos dispositivos microfluídicos com um copolímero comercial P(3HB-co-3HV) (de TianAn – China). Uma vez que este apresentava um elevado peso molecular médio (246 948 g/mol) e grau de polidispersão (1,6), a sua degradação aquando da criação de canais na superfície das amostras impregnadas não foi muito significativa e viável para o que se pretendia, revelando um baixo número médio de cisões de cadeias ($N_{cs} = 3,6$) quando exposto a 120 minutos de tratamento com UV-O₃. O outro biopolímero utilizado trata-se de um homopolímero P(3HB) que foi solicitado ao grupo de investigação do DQ/FCT. Este biopolímero apresenta um peso molecular médio inicial quatro vezes inferior ao do biopolímero comercial (64 030 g/mol) e um grau de polidispersão de 1,2. Após 120 minutos de tratamento com UV-O₃, obteve-se um número médio de cisões de cadeias bastante elevado para este homopolímero ($N_{cs} = 18,9$) e um peso molecular médio de 4,7% do seu valor inicial que, comparado com o do biopolímero comercial (18,8%) em condições idênticas, é muito mais exequível para o que se pretende neste trabalho. Deste modo o trabalho foi feito utilizando o polímero P(3HB).

Apresentam-se seguidamente as suas principais propriedades e características:

Fonte de origem: Extraído do microorganismo *Cupriavidus necator* DSM 428 tendo como fonte de carbono resíduos de óleos alimentares;

Forma natural: Na sua forma natural vem em aglomerados de cor branca (Figura 4.7-B);

Peso molecular médio (\bar{M}_w): 64 030 g/mol;

Peso molecular médio numérico (\bar{M}_n) : 53 000 g/mol;

Grau de polidispersão ($\frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n}$): 1,2;

Grau de cristalinidade: 49,5 %

Temperatura de fusão (T_f): 175 °C;

O peso molecular médio (\bar{M}_w) e o peso molecular médio numérico (\bar{M}_n), foram obtidos através da técnica de Cromatografia por Exclusão de Tamanho (SEC, *Size-Exclusion Chromatography*). O grau de polidispersão (PDI) e o número médio de cisões (N_{cs}) por macromoléculas foram calculados a partir da Equação 4.1 e Equação 4.2, respectivamente. Estes resultados foram estudados e obtidos em cooperação com o grupo de investigação do DQ/FCT. O grau de cristalinidade e a temperatura de fusão foram obtidos por DSC a partir do filme do P(3HB), realizado neste trabalho.

$$PDI = \frac{\bar{M}_w}{\bar{M}_n} \quad \text{Eq: 4. 1}$$

$$N_{cs} = \frac{\bar{M}_{no}}{\bar{M}_{nt}} \quad \text{Eq: 4. 2}$$

Onde \bar{M}_{no} e \bar{M}_{nt} representam o peso molecular médio numérico de P(3HB) na ausência e presença de tratamento com UV-O₃ a 120 minutos, respectivamente.

A Figura 4.7 A) mostra imagens de SEM (à esquerda) e de feixe de iões focados (FIB, *Focused Ion Beam*) (à direita). A imagem de SEM é referente à morfologia das células da bateria *C. necator* DSM 428 e a imagem de FIB diz respeito a grânulos de PHB dentro das células; a Figura 4.7 B) mostra a imagem do polímero P(3HB) na sua forma natural antes de ser dissolvido em clorofórmio; e a Figura 4.7 C) mostra o filme de P(3HB) obtido a partir da solução de 1% (m/m) utilizada na impregnação do papel Whatman nº1. Após a impregnação do papel Whatman nº1, numa vasilha de dimensão 14 x 14 cm², deixou-se evaporar o solvente (clorofórmio) da solução que contém o P(3HB) à temperatura do ambiente e sob fluxo de ar gerado na hotte, obtendo assim o filme.



Figura 4.7– A) Imagens de SEM das células da Bateria *C. necator* DSM 428 com P(3HB) armazenado (esquerda) e grânulos de P(3HB) dentro das células (direita); B) Forma natural do P(3HB) antes de ser dissolvido e C) Filme de P(3HB)

Assim como nos substratos de papel, realizaram-se análises e caracterizações da superfície do filme do biopolímero P(3HB) obtido, utilizando os mesmos métodos experimentais executados nos substratos de papel:

4.2.1 Microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios-X

A microscopia electrónica de varrimento foi utilizada para fornecer informação relativa ao filme de P(3HB). Conjuntamente a EDS foi usada para identificar os elementos químicos presentes no filme.

Na Figura 4.8 encontra-se representada a imagem da estrutura morfológica do Filme P(3HB) obtido por SEM, o seu respectivo espectro de EDS.

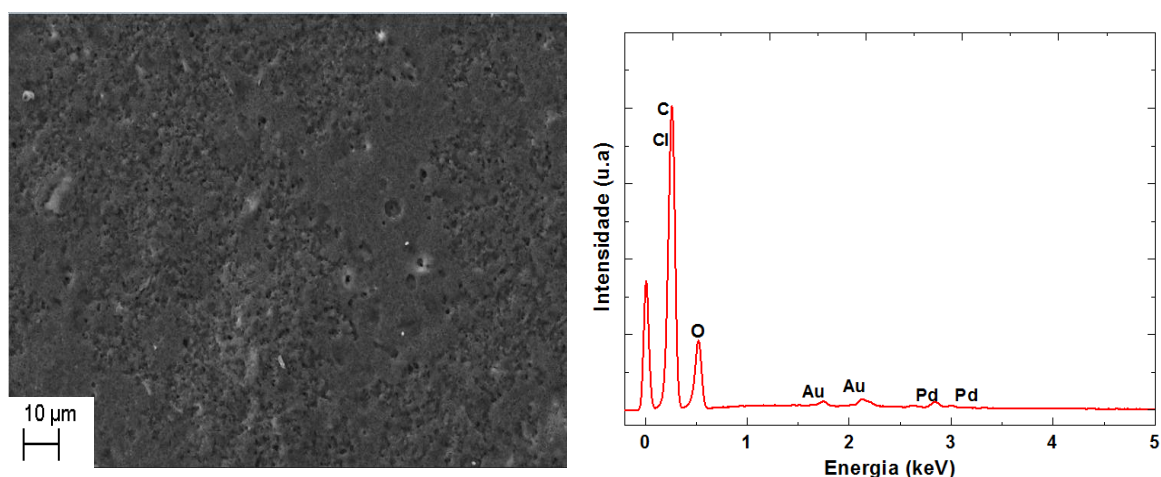


Figura 4.8 – A) Imagem do Filme P(3HB) obtida por SEM e B) Espectro de EDS do Filme P(3HB).

Em relação à imagem obtida por SEM do Filme P(3HB), é visível uma estrutura morfológicamente heterogênea com aspecto rugoso e pode distinguir-se a presença de poros na sua superfície. No respectivo espectro de EDS visualiza-se a presença dos seguintes elementos químicos: cloro, carbono, oxigênio, ouro e paládio. Os picos que fornecem informação sobre o material são os que correspondem às energias 0,257 keV e 0,520 keV, que são referentes ao carbono e oxigênio, respectivamente. O carbono e o oxigênio, juntamente com o hidrogênio, são os elementos presentes na estrutura química do polímero P(3HB). O pico que se situa em $E=0$ keV é característico do equipamento, portanto, não fornece informação sobre o material em estudo. O elemento cloro presente no espectro corresponde ao vestígio do solvente clorofórmio (CHCl_3) utilizado na preparação do filme. Os elementos ouro e paládio foram utilizados para cobrir a amostra antes da análise do SEM.

4.2.2 Difracção de raios-X

A Figura 4.9 mostra o difractograma de difração de raios-x do filme P(3HB). No difractograma obtido é evidente a presença de vários picos de difração, mostrando deste modo que no polímero em estudo existem regiões tridimensionais, cristalinas. Como pode ser observado, estes picos de difracção estão localizados em 2θ igual a $13,5^\circ$ (020); $16,6^\circ$ (110); $19,8^\circ$ (021); $22,2^\circ$ (101); $25,4^\circ$ (121); $27,2^\circ$ (070) e $30,5^\circ$ (002), típicos do polímero P(3HB) semicristalino, similar ao P(3HB) mostrado por Garcia, M., Catoni, S., e Dobrovol'skaya et al. [69]–[71].

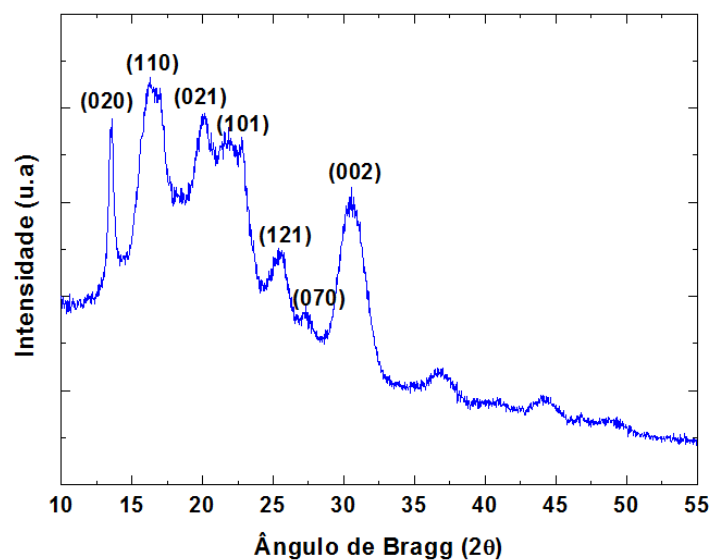


Figura 4.9 – Difractograma do Filme P(3HB).

4.2.3 Ângulo de contacto

A Figura 4.10 mostra o ângulo de contacto mensurado para o Filme P(3HB), que foi de $91,5 \pm 0,5^\circ$, mostrando, assim, ter pouca afinidade com a água. Deste modo pode ser considerado um biopolímero hidrófobo.

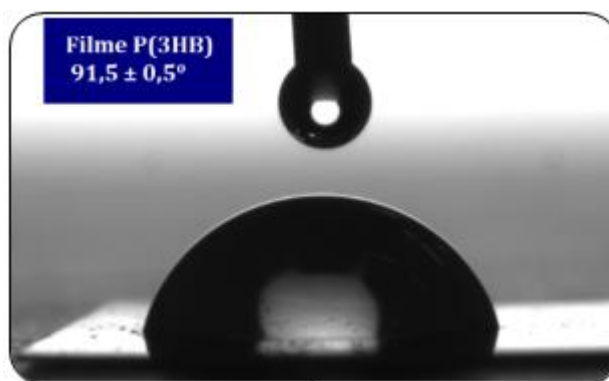


Figura 4.10– Ângulo de contacto do Filme P(3HB).

4.2.4 Espectroscopia do infravermelho por transformada de Fourier modo ATR

O espectro da Figura 4.11 é referente ao filme do P(3HB). Neste espectro podem-se observar diversas bandas de absorção que correspondem a estiramentos e flexões específicas de grupos funcionais presentes no polímero P(3HB). As bandas com os números de ondas em 2978, 5 e 2928, 7 cm^{-1} correspondem ao estiramento das ligações do grupo metilo (CH_3) e metileno (CH_2), respectivamente. O pico que se encontra bem descrito e cujo número de onda está na posição 1724, 2 cm^{-1} , diz respeito ao estiramento das ligações covalentes duplas do grupo carbonilo ($\text{C}=\text{O}$). Nas posições 1452, 8 e 1389, 2 cm^{-1} encontram-se dois picos que correspondem a flexão (*bending*) das ligações do grupo metileno (CH_2) e metilo (CH_3), respectivamente. E por fim, aparecem no espectro mais dois estiramentos, primeiro em 1261, 2 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações do grupo metino (CH) e segundo em 1120, 3 cm^{-1} referente ao estiramento das ligações do grupo éter ($\text{C}-\text{O}-\text{C}$) [72], [73].

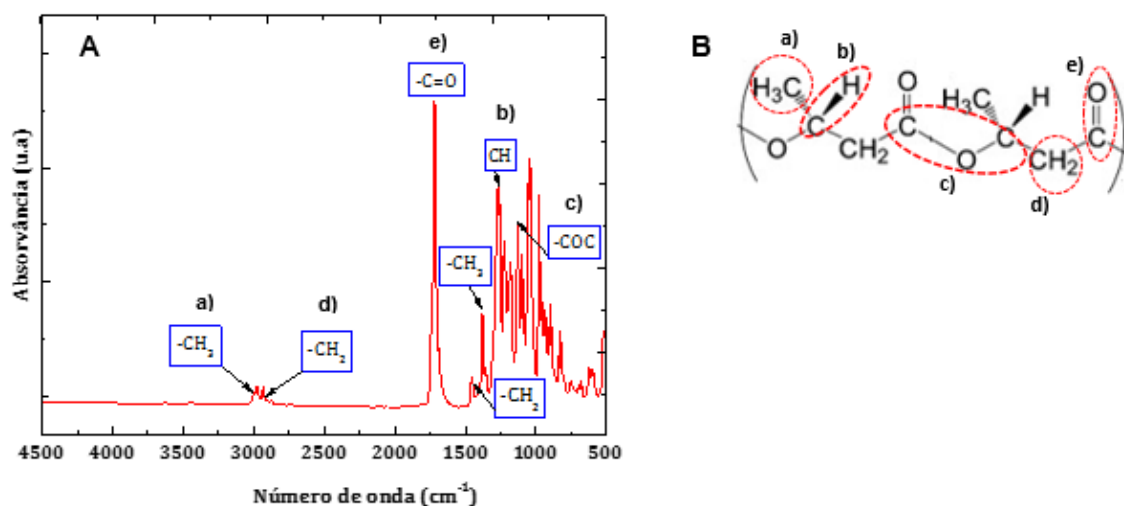


Figura 4.11- A) Espectro de FTIR-ATR do filme obtido a partir da solução de P(3HB) e B) estrutura química do polímero P(3HB).

Através de FTIR-ATR analisaram-se filmes de P(3HB), que foram submetidos a diferentes tempos de radiação UV e ozono, com o intuito de avaliar o efeito resultante deste tratamento sobre este material polimérico (Figura 4.12).

O pico que melhor permite visualizar o impacto que a exposição UV- O_3 teve sobre o filme do P(3HB) é o que se encontra em 1724,2 cm^{-1} . Para os diferentes tempos de tratamento com UV- O_3 indicados no espectro da Figura 4.12, praticamente não se registou uma diferença significativa até aos 90 minutos no referido pico. Contudo, para o tempo de tratamento de 120 minutos verificou-se uma diminuição muito acentuada nesse pico o que pode significar que as ligações duplas do grupo ($\text{C}=\text{O}$) poderão ter sofrido degradações por processo foto-oxidativo e produzido radicais livres que, em consequência, fizeram com que os grupos carbonilos não absorvessem fortemente a energia da luz infravermelha do equipamento de FTIR.

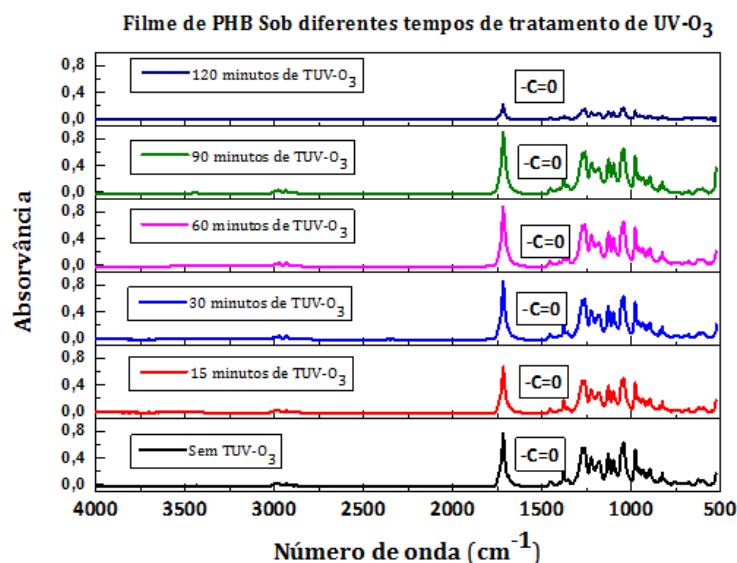


Figura 4.12- Espectros de FTIR-ATR dos filmes de P(3HB) submetidos a diferentes tempos de UV-O₃.

4.2.5 Análises térmicas

O estudo térmico também foi realizado para o filme do P(3HB) obtido por evaporação do clorofórmio após impregnação do papel Whatman nº1. Com o objectivo de observar e analisar o comportamento deste material em função da temperatura, o filme de P(3HB) foi aquecido de 0 °C a 550 °C.

Análise Termogravimétrica (TG)

Na Figura 4.13 estão representados termogramas relativos a filmes de P(3HB): **A)** filme de P(3HB) sem tratamento com UV-O₃ e **B)** filmes de P(3HB) tratados com 30, 60, 90, 120, 240 e 360 minutos de UV-O₃. Ao observar o termograma da Figura 4.13 A) nota-se que o filme apresenta três perdas de massa no intervalo de temperaturas caracterizado. A primeira perda de massa (cerca de 3,19%) acontece no intervalo de temperaturas 62,0–220,0 °C e pode estar relacionada com a evaporação do solvente (clorofórmio) utilizado na preparação dos filmes. A segunda perda de massa acontece no intervalo de temperaturas 257,0–304,0 °C, tratando-se da degradação ou clivagem dos grupos ésteres presentes na estrutura do biopolímero P(3HB) por reacção de eliminação-β [74]. A perda de massa resultante desta transformação é de 85,55%. A terceira e última perda de massa dá-se no intervalo de temperaturas 314,0–550,0 °C e corresponde a uma perda de massa de 12,12%. Visualizando o referido termograma caracterizado é notório que o filme P(3HB) perdeu toda a sua massa inicial ao fim de aproximadamente 550,0 °C. No que se refere ao número de perdas de massa, os termogramas da Figura 4.13 B) também apresentam três perdas de massa. No entanto, a diferença que se verifica reside no facto de, ao irradiarem os filmes com UV-O₃ e à medida que o tempo desta

irradiação aumenta, as perdas de massa no intervalo de temperaturas com degradação mais acentuada (degradação dos grupos ésteres) diminuem, como se pode visualizar no gráfico da Figura 4.13 B) e na Tabela do Anexo I. Este resultado pode ser justificado como modificação ou alteração da estrutura molecular do biopolímero P(3HB) provocado pelo aumento contínuo de UV-O₃. Portanto, com cisões e rupturas nas cadeias poliméricas do P(3HB), o material polimérico fica instável e com cadeias monoméricas reduzidas.

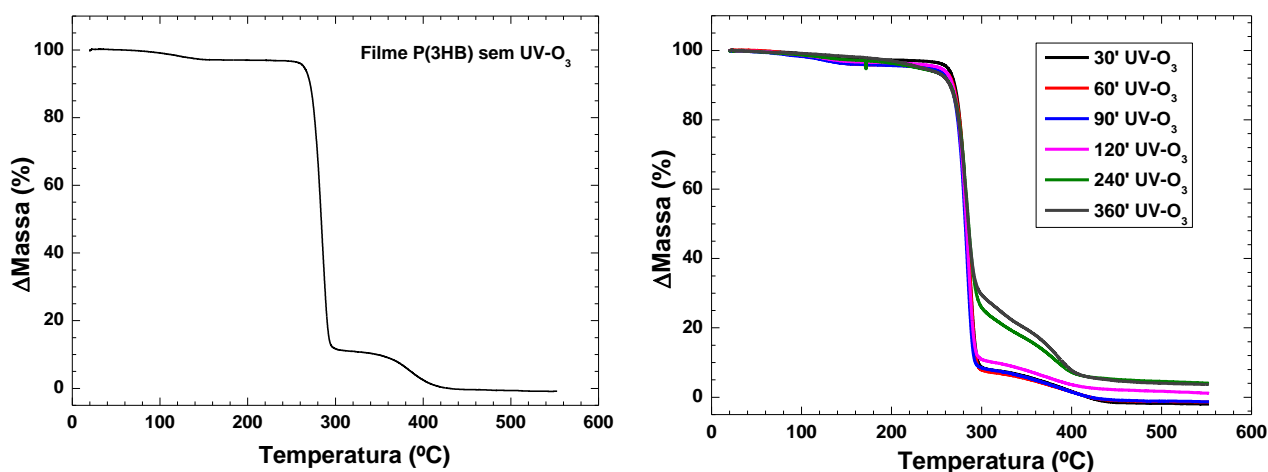


Figura 4.13 – Análise termogravimétrica dos filmes de P(3HB): A) filme sem tratamento com UV-O₃ e B) filmes tratados com diferentes tempos de UV-O₃.

Para comparar os resultados obtidos anteriormente, recorreu-se à análise de TG obtida pela Cruz et al a partir de grânulos de P(3HB) puro (Figura 4.14). A degradação térmica do biopolímero permaneceu estável até 220 °C (com uma ligeira perda de massa $\Delta m=1\%$). A perda de massa mais acentuada do P(3HB) puro deu-se num único passo e corresponde a uma temperatura máxima de degradação de $T_{max} = 266$ °C. A perda de massa resultante desta transformação representou 94% da massa inicial da amostra [75]. Ao fim de aproximadamente 600 °C a amostra perdeu toda a massa inicial.

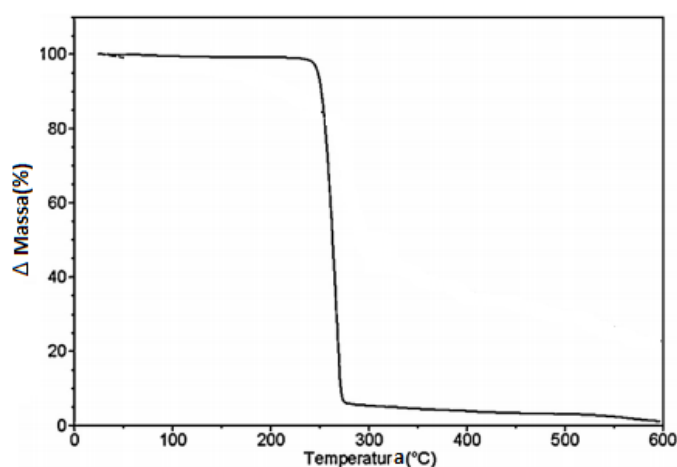


Figura 4.14 – Análise termogravimétrica de grânulos de P(3HB) puro (adaptado de [75]).

A curva de TG da Figura 4.13 A) é referente ao filme obtido através da solução de P(3HB), preparada com grânulos de P(3HB) puro, e utilizada na impregnação do papel Whatman nº1. Esperava-se que esta curva e a obtida pela Cruz et al (Figura 4.14) fossem idênticas, pois foi utilizado o mesmo polímero. Todavia, não é o que se observa na Figura 4.13 A), que apresenta três perdas de massa no intervalo de temperaturas caracterizado e na Figura 4.14, que apresenta uma única perda de massa no mesmo intervalo. Contudo, encontrou-se uma tese de doutoramento de Miriam Machado (2008) que apresenta um estudo sobre as propriedades mecânicas, térmicas e reológicas do P(3HB) e compósitos de P(3HB)/pó de madeira, com o intuito de melhorar estas propriedades e reduzir o custo do P(3HB) [76], [77]. Neste estudo Machado obteve uma curva de TG para o compósito P(3HB)/pó de madeira, de concentração 70/30 (m/m), muito semelhante à obtida para o filme de P(3HB) da Figura 4.13-A. Uma vez que a análise da curva de TG para o compósito com conteúdo de celulose obtida por Machado apresenta semelhança com o filme da Figura 4.13 A) no que respeita às perdas de massa obtidas, conclui-se que a solução de P(3HB), da qual resultou o filme, provavelmente também tinha vestígios de celulose, pois foi utilizada na impregnação do papel. Esta pode ter sido a razão pela qual se verificaram diferenças entre as curvas de TG obtida por Cruz et al e a obtida neste trabalho.

Calorimetria Diferencial de Varrimento (DSC)

Os termogramas da Figura 4.15 dizem respeito à análise de calorimetria diferencial de varrimento dos filmes de P(3HB) na ausência e presença de tratamentos com UV-O₃. Nos termogramas representados existem três picos endotérmicos que estão associados às perdas de massa estudadas anteriormente na análise termogravimétrica. Através da Figura 4.15 A) obteve-se uma temperatura de fusão de $T_f = 175,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ para o filme de P(3HB) sem tratamento. Este valor está de acordo com o encontrado na literatura relativamente à T_f do biopolímero P(3HB) [73], [74]. Para esta temperatura de fusão, observa-se um pico que apresenta uma entalpia de fusão de $\Delta H_f = 72,16\text{ J/g}$. Com este valor da entalpia de fusão e com a Equação 2.6 calculou-se o grau de cristalinidade do filme de P(3HB) sem tratamento e dos filmes de P(3HB) que foram tratados com UV-O₃ (Tabela 4.1). Assumiu-se a partir da literatura que a entalpia de fusão para o P(3HB) 100% cristalino é de $\Delta H_0 = 146\text{ J/g}$ [54], [73]. Conforme representado na Tabela 4.1, o valor do grau de cristalinidade obtido para o filme de P(3HB) sem tratamento foi de 49,5%. Verificou-se que à medida que se submetem os filmes à radiação UV e ozono e aumenta o tempo de tratamento, o grau de cristalinidade destes vai diminuindo até 23,4%, correspondendo ao tempo máximo de tratamento utilizado (360 minutos). Esta diminuição no valor do grau de cristalinidade pode estar relacionado com cisões das cadeias poliméricas provocadas pela radiação UV e ozono.

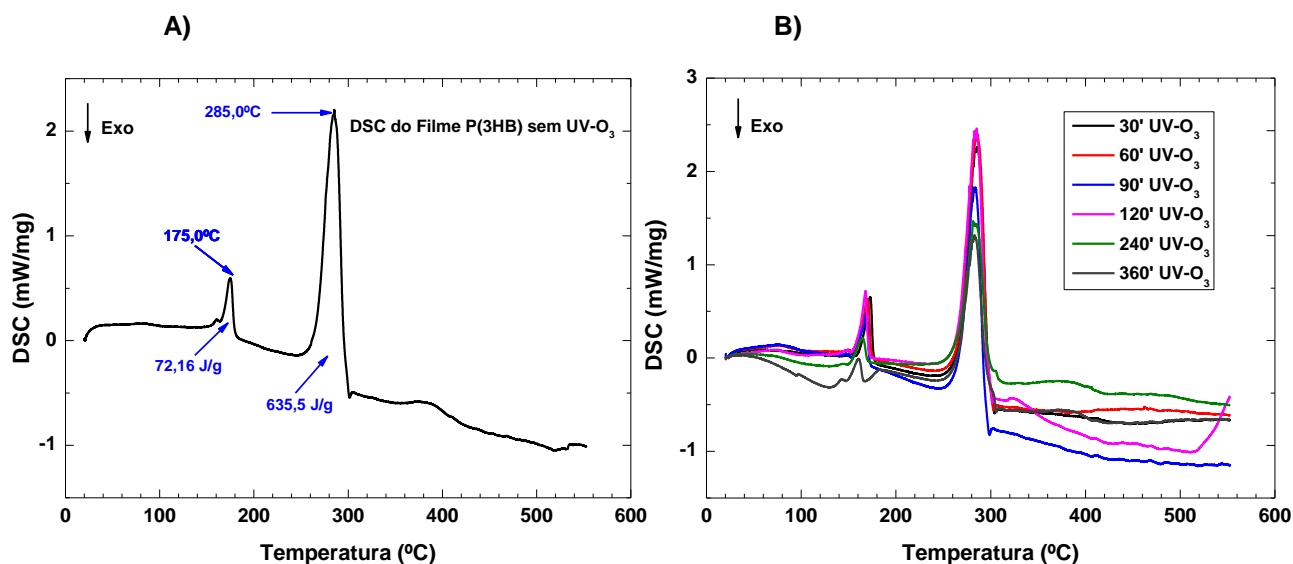


Figura 4.15 – Análise de calorimetria diferencial de varrimento dos filmes do biopolímero P(3HB): A) filme sem tratamento com UV-O₃ e B) filmes com diferentes tempos de tratamento com UV-O₃.

Tabela 4.1 – Propriedades térmicas e grau de cristalinidade dos filmes de P(3HB) na ausência e na presença de tratamento nos tempos indicados.

Amostra: Filme P(3HB) 1% (m/m)	T _f (°C)	ΔH _f (J/g)	Cristalinidade (X _c) (%)
Filme sem UV-O ₃	175,0	72,2	49,5
Filme 30' UV-O ₃	172,0	71,8	49,2
Filme 60' UV-O ₃	169,0	69,9	47,9
Filme 90' UV-O ₃	168,0	65,7	45,0
Filme 120' UV-O ₃	167,0	64,6	44,2
Filme 240' UV-O ₃	165,0	35,1	24,0
Filme 360' UV-O ₃	160,0	34,2	23,4

4.3 Caracterização do papel Whatman nº1 impregnado com polihidroxibutirato [P(3HB)]

4.3.1 Microscopia electrónica de varrimento e espectroscopia dispersiva de raios - X

A microscopia electrónica de varrimento foi utilizada para fornecer informação relativa à alteração da morfologia das amostras de papel Whatman nº1 após impregnação com P(3HB) e adicionalmente utilizada para visualizar a influência da realização do tratamento UV e ozono na degradação do polímero nas fibras do papel.

Na Figura 4.16 visualizam-se imagens de SEM que dizem respeito ao papel Whatman nº1 (A e B) e amostra de papel Whatman nº1 impregnada com P(3HB) (C, D e E). Ao comparar o papel Whatman nº1 antes e após a impregnação com P(3HB), o primeiro facto que se pode constatar são as superfícies e as bordas das fibras de celulose que antes apresentavam um aspecto mais rugoso e, entretanto, após a impregnação passaram a ser mais lisas. À medida que se ampliam as imagens das amostras impregnadas consegue observar-se com maior nitidez a presença de vestígios do polímero, com um aspecto viscoso, sobre e entre as fibras de celulose. Estas imagens mostram assim que houve uma difusão da solução de P(3HB) na estrutura das fibras do papel Whatman nº1.

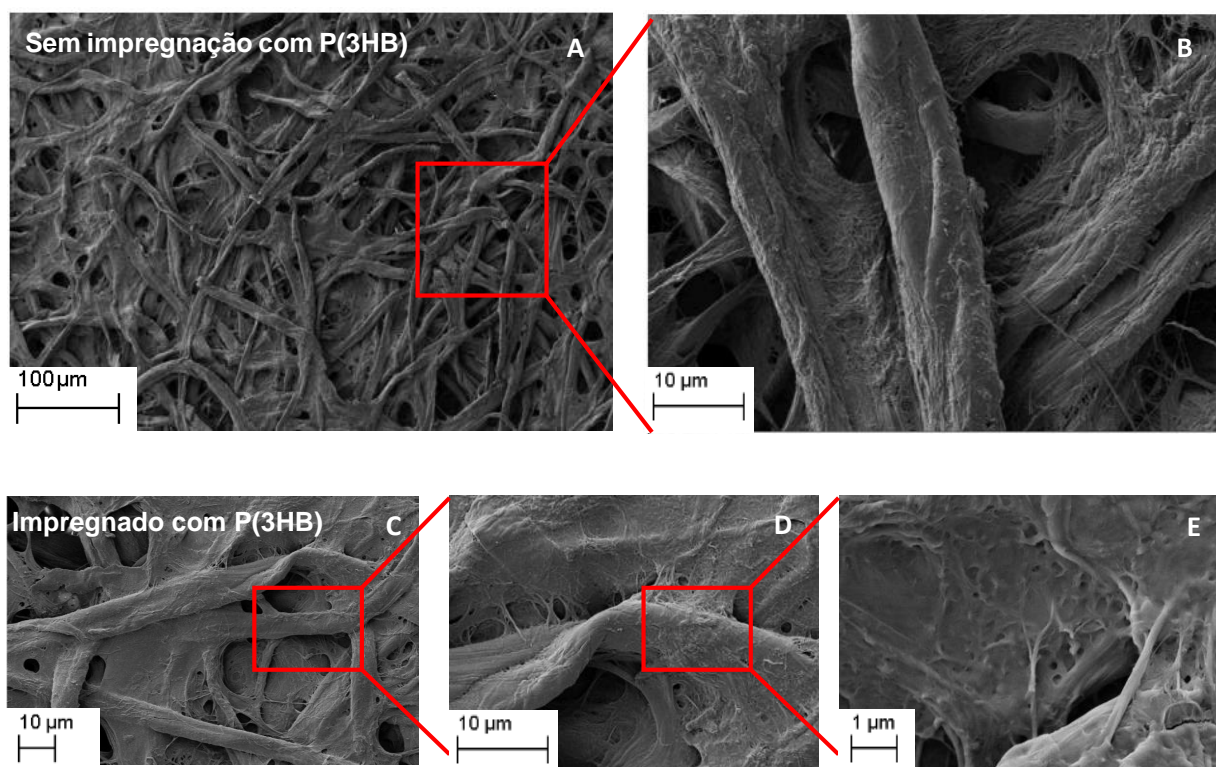


Figura 4.16 – Comparação morfológica entre o papel Whatman nº1 (A,B) e o papel Whatman nº 1 impregnado com P(3HB) (C,D,E).

Na Figura 4.17 encontra-se representada uma imagem da estrutura morfológica do papel Whatman nº1 impregnado com o polímero (A), o seu espectro de EDS (B), e os mapeamentos dos elementos presentes na estrutura química do papel modificado (C e D).

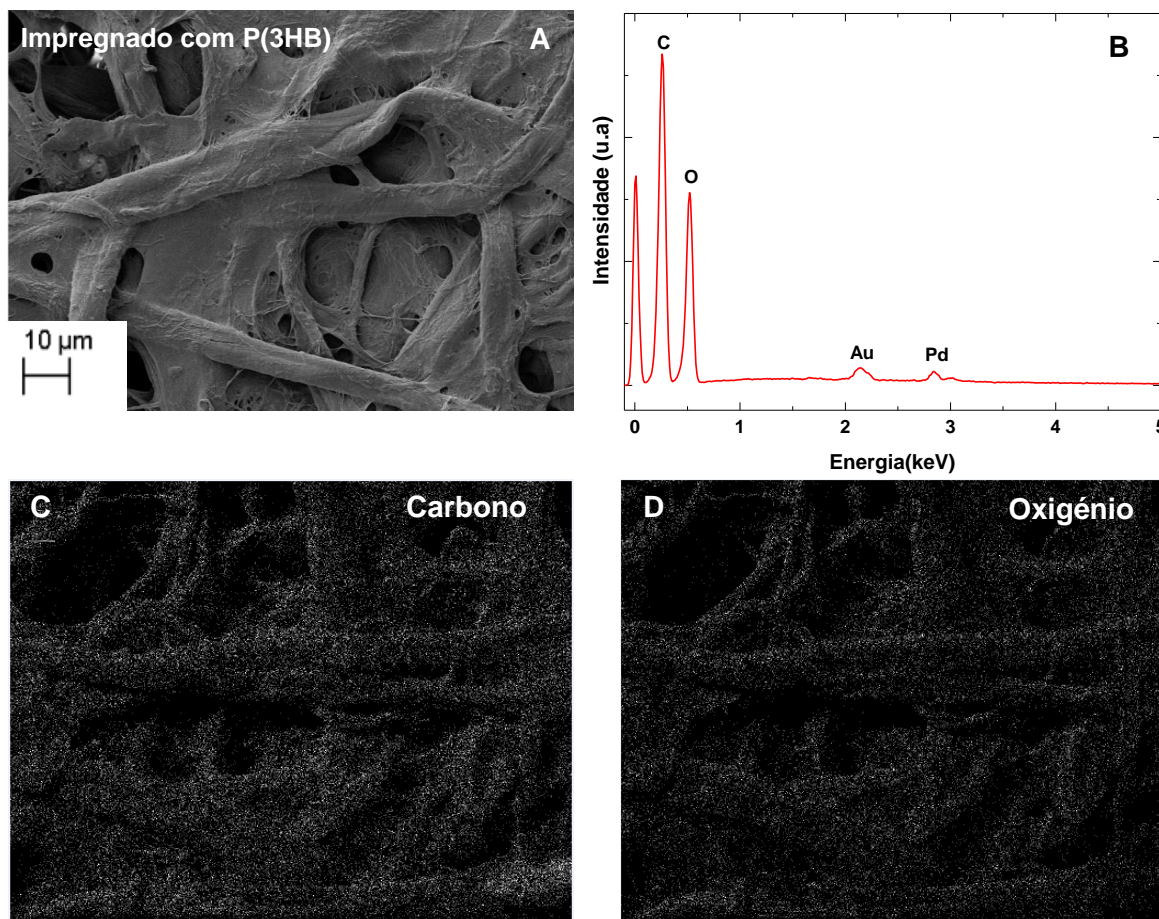


Figura 4.17– A) Imagem do papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB); B) respectivo espectro de EDS; C) Mapeamento de Carbono e D) Mapeamento de oxigénio.

As imagens de SEM da Figura 4.18 ilustram a influência que a realização do tratamento com UV- O_3 teve sobre as amostras de papel Whatman nº1 impregnadas com P(3HB) à medida que o tempo do tratamento aumentava. Na Figura 4.18 A), a amostra foi submetida a 30 minutos de exposição com radiação UV e ozono. Este tempo de exposição a que a amostra foi sujeita provocou o aparecimento de poros no polímero sobre a superfície das fibras, o que pode estar relacionado com a acção do calor exercida sobre o material polimérico. Na imagem da Figura 4.18 B), com o aumento do tempo de exposição, verifica-se um desaparecimento significativo desses poros. Na Figura 4.18 C) visualizam-se pequenos vestígios de polímero entre as fibras do papel. As imagens B e C de SEM da Figura 4.18 aparentemente parece que estão sequencialmente trocadas, no entanto, a imagem B foi tratada com 60 minutos de UV- O_3 e a C foi tratada com 90 minutos. A razão pela qual a imagem C parece ter mais polímero na superfície após maior tempo de tratamento que a B, tem a ver com a área selecionada para obter as imagens de SEM, que foi diferente nas duas amostras. Relativamente à Figura 4.18 D), em que o tempo da exposição aumentou (120 minutos), o que se observa são as fibras de celulose

sem vestígios do P(3HB), o que ao fim e ao cabo é o que se pretende para a criação dos canais bidimensionais.

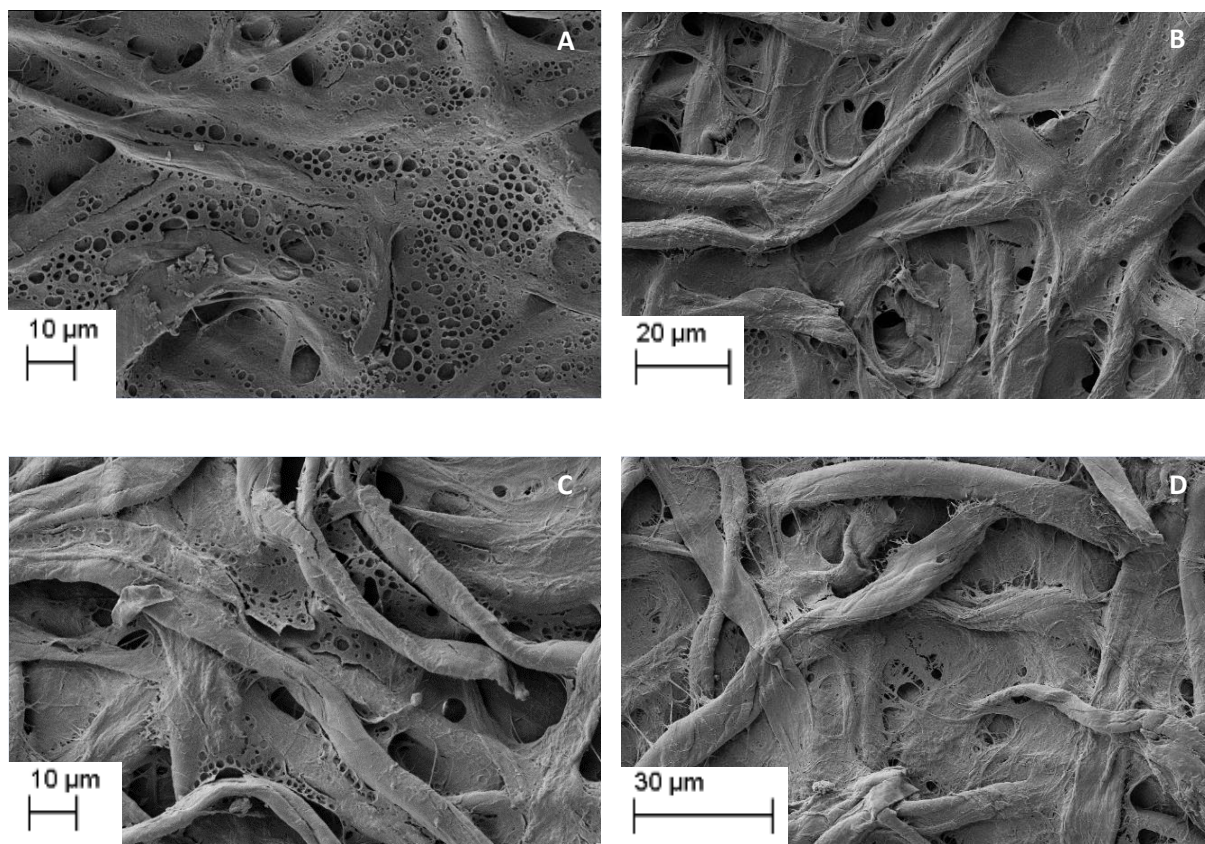


Figura 4.18 – Amostra de papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB) e tratado com UV- O₃: A) 30 minutos; B) 60 minutos; C) 90 minutos e D) 120 minutos.

4.3.2 Caracterização das superfícies pós-degradação

Os valores do ângulo de contacto em água (WCA) citados na Tabela 4.2 mostram que o tratamento com UV-O₃ provocou a redução dos ângulos de contacto das amostras de Papel Whatman/PHB (PWP). De acordo com a Tabela 4.2, a amostra PWP120 teve uma redução mais acentuada do que as restantes amostras após 120 minutos de tratamento, podendo-se, portanto, considerar a sua superfície como super-hidrofílica. Este estudo e o subsequente (FTIR-ATR) foram importantes uma vez que permitiram determinar o tempo adequado de tratamento com UV-O₃ para a criação dos canais de condução e zonas de depósito e testes.

Em Anexo II estão representadas as imagens do ângulo de contacto das superfícies das amostras da Tabela 4.2.

Tabela 4.2- Valores de WCA para amostras com e sem tratamento nos tempos indicados

Tempo de Tratamento (min)	Nome da amostra	WCA (°) médio	Desvio (±) médio
0	PWPST	125,7	0,6
15	PWP15	118,0	0,2
30	PWP30	99,8	0,1
60	PWP60	72,1	0,3
90	PWP90	45,4	0,2
120	PWP120	<15,0	1,0

Posteriormente recorreu-se às análises de FTIR-ATR para averiguar se existe relação com o que foi observado nas análises de WCA. A Figura 4.19 A) mostra o espectro de FTIR-ATR do papel Whatman nº1 e do papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB). A seta representada na Figura 4.19 A) identifica o pico cujo estiramento corresponde ao grupo C=O presente na estrutura do polímero P(3HB), indicando deste modo a presença do polímero na estrutura impregnada. As Figuras 4.19 B) e C) mostram os espectros de FTIR-ATR das amostras de PWP sem tratamento (ST) e com tratamento com UV-O₃ nos tempos de exposição indicados. Na Figura 4.19 C), que é uma ampliação da região 1250-2000 cm⁻¹ da Figura 4.19 B), nota-se que as amostras PWP com 30 e 60 minutos de tratamento apresentam valores de absorvância maiores do que o da amostra PWP sem tratamento. Porém as amostras com 90 e 120 minutos de tratamento apresentam valores de absorvância menores do que o da amostra PWP sem tratamento, sendo a amostra PWP120 a que apresenta um valor mínimo de absorvância tanto em 1722,5 cm⁻¹, correspondente ao estiramento do grupo C=O, como em 1278,4 cm⁻¹, que corresponde ao estiramento do grupo C-O [78]. Esta diminuição de bandas e picos localizados em frequência de estiramentos de grupos oxigenados (C=O e C-O) e a redução de WCA evidenciam a inserção de novos grupos oxigenados nas superfícies das amostras de PWP tratadas (o tratamento com UV foi realizado na presença de ozono), conferindo o carácter hidrófilo [79].

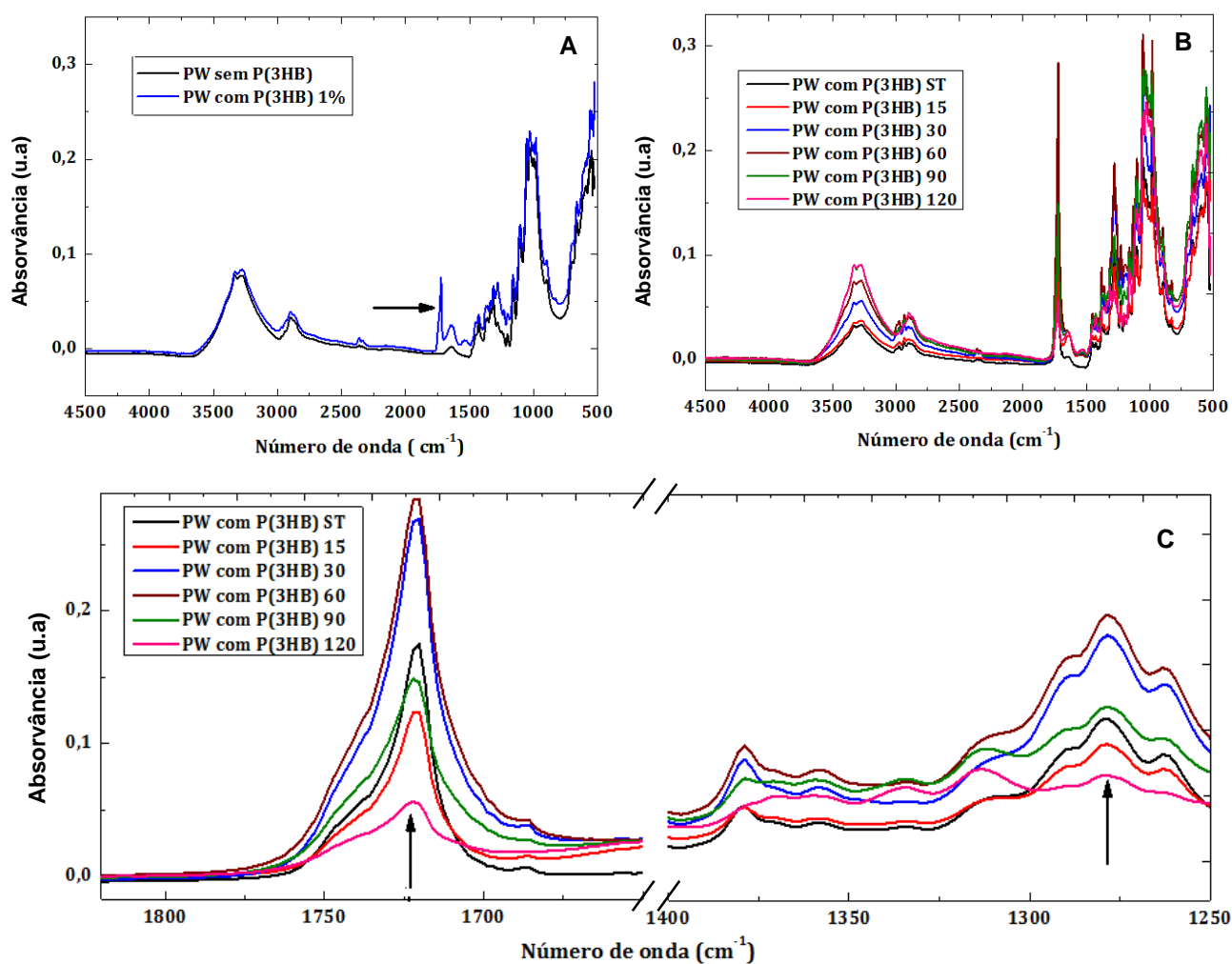


Figura 4.19 - A) Análise de FTIR-ATR do papel Whatman nº1 e do papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB); B) FTIR-ATR do papel Whatman nº 1 com P(3HB) submetido a diferente tempos de tratamento com UV-O3 e C) ampliação da região 1250-2000 cm⁻¹ da imagem B.

4.4 Ensaios colorimétricos

O objetivo desta fase do trabalho é a detecção e quantificação de glucose em soluções aquosas. Deste modo, para detectar e consequentemente quantificar o analito, recorreu-se ao método da detecção colorimétrica.

De forma a facilitar a interpretação, aumentar a precisão, obter uma gama mais abrangente de concentração para o analito, utilizaram-se múltiplos indicadores de oxidação/redução para a detecção de um único analito. Esta parte do trabalho teve como referência o trabalho desenvolvido por Dungchai e colegas [45] e a tese de dissertação elaborada por Mafalda N. Costa [46], os quais utilizaram múltiplos indicadores para determinação de concentração de vários analitos (*Dungchai et al., 2010*) e de concentração de um único analito (*Costa, 2012*). A multiplicidade de indicadores, para além das vantagens já citadas, ainda oferecem uma maior discriminação visual entre diferentes concentrações, permitindo uma facilidade na leitura dos resultados por pessoas não especializadas – uma das características dos testes POCs.

Um estudo prévio, no sentido de otimizar o volume de reagentes na zona de testes e volume de amostra na zona de depósito, foi realizado com diferentes volumes utilizando corantes alimentares. Para os reagentes utilizou-se os seguintes volumes (1, 1,5 e 2 μL) e para a amostra utilizou-se estes volumes (10, 12 e 13 μL). Às vezes nos testes de tiras de papel que têm sido objecto de estudo o maior custo é proveniente dos reagentes [45]. Tendo isto em conta, definiu-se o volume da solução a utilizar como o volume mínimo necessário para abranger toda a área delimitada por barreiras hidrófobas. Para as zonas de testes utilizou-se 2 μL de volume de reagentes e para a zona de depósito utilizou-se 13 μL de volume de soluções de glucose.

Para analisar o funcionamento do biossensor desenvolvido utilizaram-se 11 soluções padrão com diferentes concentrações de glucose, incluindo-se concentrações clinicamente relevantes.

O princípio dos ensaios colorimétricos é utilizar a mudança de cor de cada indicador oxidativo e a intensidade da cor em diferentes concentrações do analito para a sua detecção e quantificação. Na Figura 4.20 pode-se visualmente analisar a mudança de cor de cada indicador e a intensidade da cor para diferentes concentrações dos dispositivos digitalizados. Para concentração de 0,5 mM de glucose não é possível discriminar a cor dos indicadores. Para as concentrações entre 1 mM e 10 mM visualiza-se uma intensificação da cor magenta na zona de teste mais à esquerda (zona do indicador AB) e na zona de teste intermédia (zona do indicador AB+KI), à medida que a concentração de glucose aumenta. Porém, para concentrações de glucose superiores e igual a 20 mM visualiza-se na zona de teste correspondente ao indicador KI uma intensificação regular do castanho, característico deste indicador, até à concentração de 100 mM de glucose. Para o indicador AB+KI também, a partir da concentração 20 mM, é possível notar que a cor do indicador KI começa a surgir misturada com a cor do indicador AB, tornando-se mais evidente com o aumento da concentração da glucose.

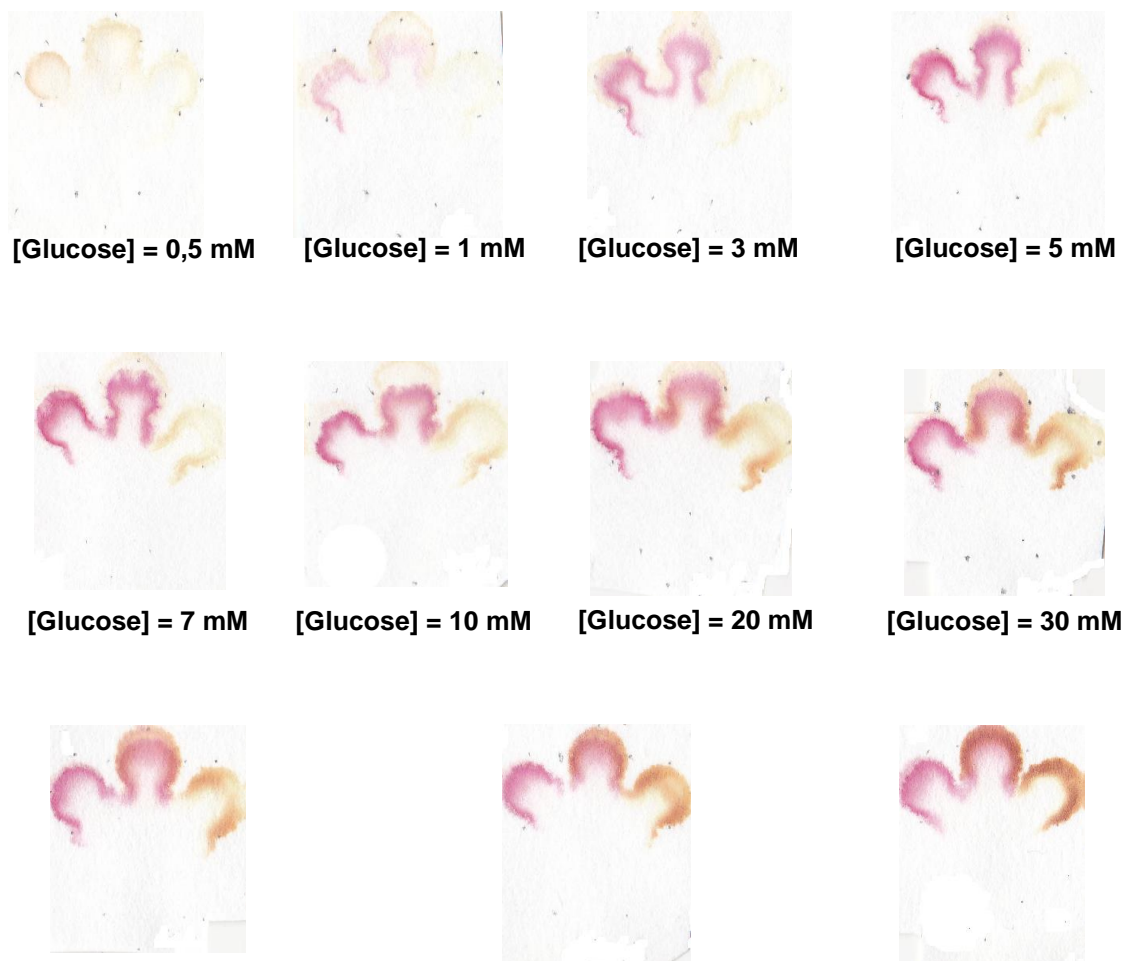


Figura 4.20 – Biossensores de papel com os resultados obtidos para diferentes concentrações de glucose.

Os resultados obtidos na Figura 4.20 com os biossensores de papel foram analisados com recurso ao *software* de análise de imagem *ImageJ*. Esta análise teve em consideração concentrações de glucose entre 0,5 mM e 30 mM, que abrangem a região das concentrações de glucose de interesse clínico [80], [81].

O *software imageJ* foi utilizado na análise RGB (vermelho, verde e azul) das zonas de testes onde foram depositados os indicadores. Nesta análise, as intensidades de cada canal RGB variam entre 0 e 255, sendo todas 0 quando a cor é preta e 255 quando a cor é branca. Este *software* possibilita obter numa dada análise a média da intensidade dos pixéis do canal vermelho, verde e azul. Para a quantificação da resposta colorimétrica nas zonas de teste onde foram depositados os indicadores o processo ideal seria a selecção de uma única área em cada zona de teste, pois facilitaria a automatização. Todavia, ao utilizar este processo para construção de gráficos RGB relativos aos indicadores, obtiveram-se gráficos cujas amplitudes de intensidade foram demasiado pequenas - com

pontos dos gráficos mais próximo da intensidade 255 do que do 0 (Anexo III). Os resultados obtidos anteriormente devem-se às seguintes razões: algumas zonas de testes onde os indicadores foram depositados não apresentam coloração uniforme; e mesmo em algumas verificam-se ligeiros transbordos dos reagentes. Por esse motivo, selecionaram-se manualmente duas áreas com coloração uniforme em cada zona de teste e realizou-se a média das duas áreas. Os resultados obtidos através da seleção manual encontram-se representados na Figura 4.21. Cada ponto dos gráficos representados corresponde à média de dois ensaios distintos - sendo as barras de erro, o desvio padrão entre os ensaios realizados.

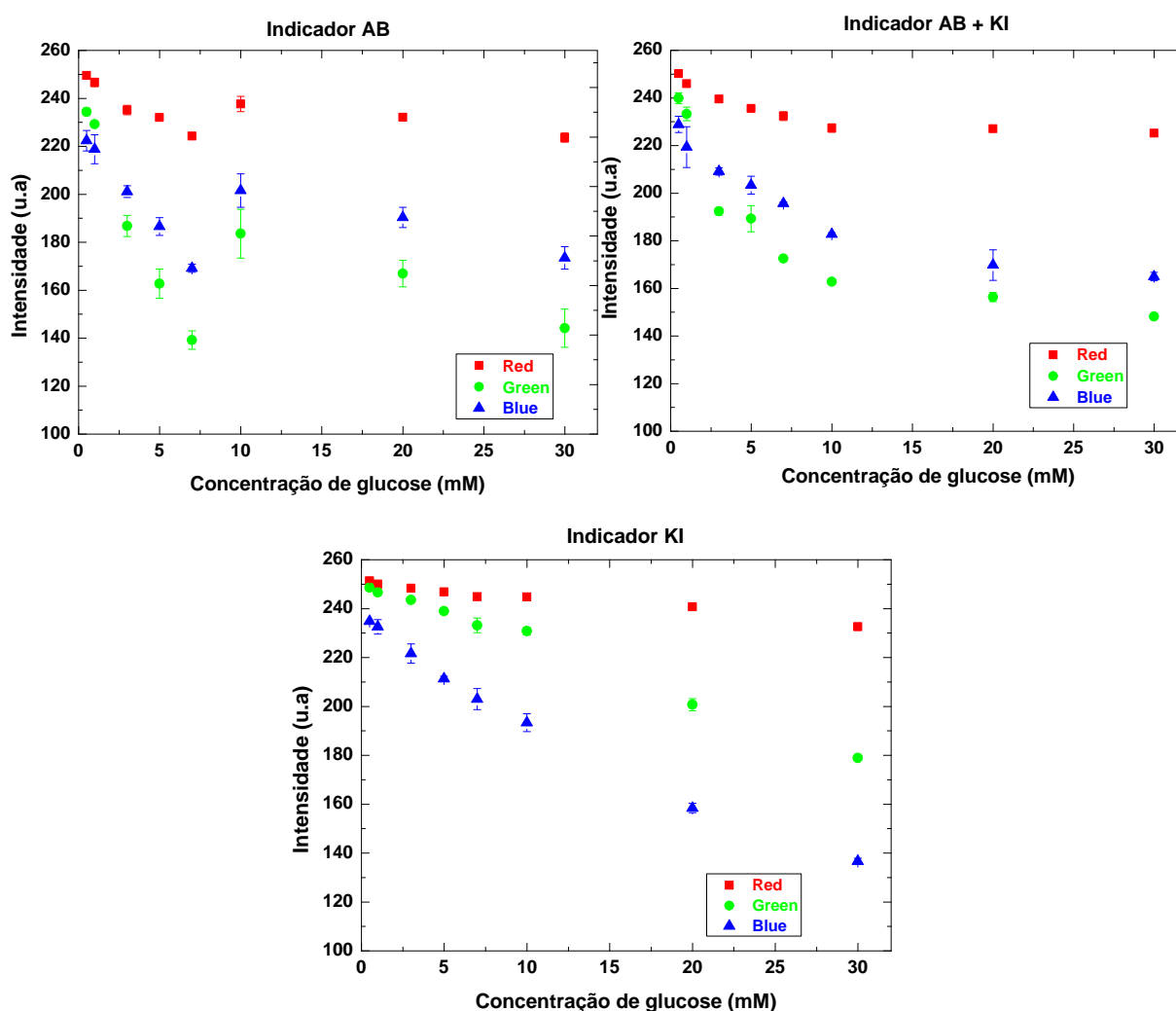


Figura 4.21 – Gráficos da análise RGB das zonas de testes correspondentes ao indicador AB, AB+KI e KI.

Ao observar os gráficos da Figura 4.21, verifica-se que os canais RGB demonstram comportamentos similares nos três indicadores representados. Portanto, basta selecionar-se um único canal em cada um dos indicadores para caracterizar o seu comportamento em função da concentração de glucose.

Para o indicador AB, o intervalo de concentrações que este indicador consegue quantificar situa-se entre os 0,5 e 7 mM. À medida que a concentração de glucose aumenta verifica-se uma diminuição regular da intensidade colorimétrica e após concentração 10 mM, este indicador satura-se. Deste modo, utilizou-se o intervalo de concentrações de glucose quantificável por este indicador e construíram-se rectas de calibração relativas aos canais RGB (Figura 4.22). Após análise das três rectas de calibração, seleccionou-se o canal verde para caracterizar o comportamento do indicador em função da concentração de glucose. Entre os canais RGB da Figura 4.22, o canal verde é o que apresenta o maior declive da recta, portanto, é o que proporciona maior amplitude de intensidade entre as concentrações de glucose e por conseguinte permite uma maior precisão na determinação da concentração de glucose.

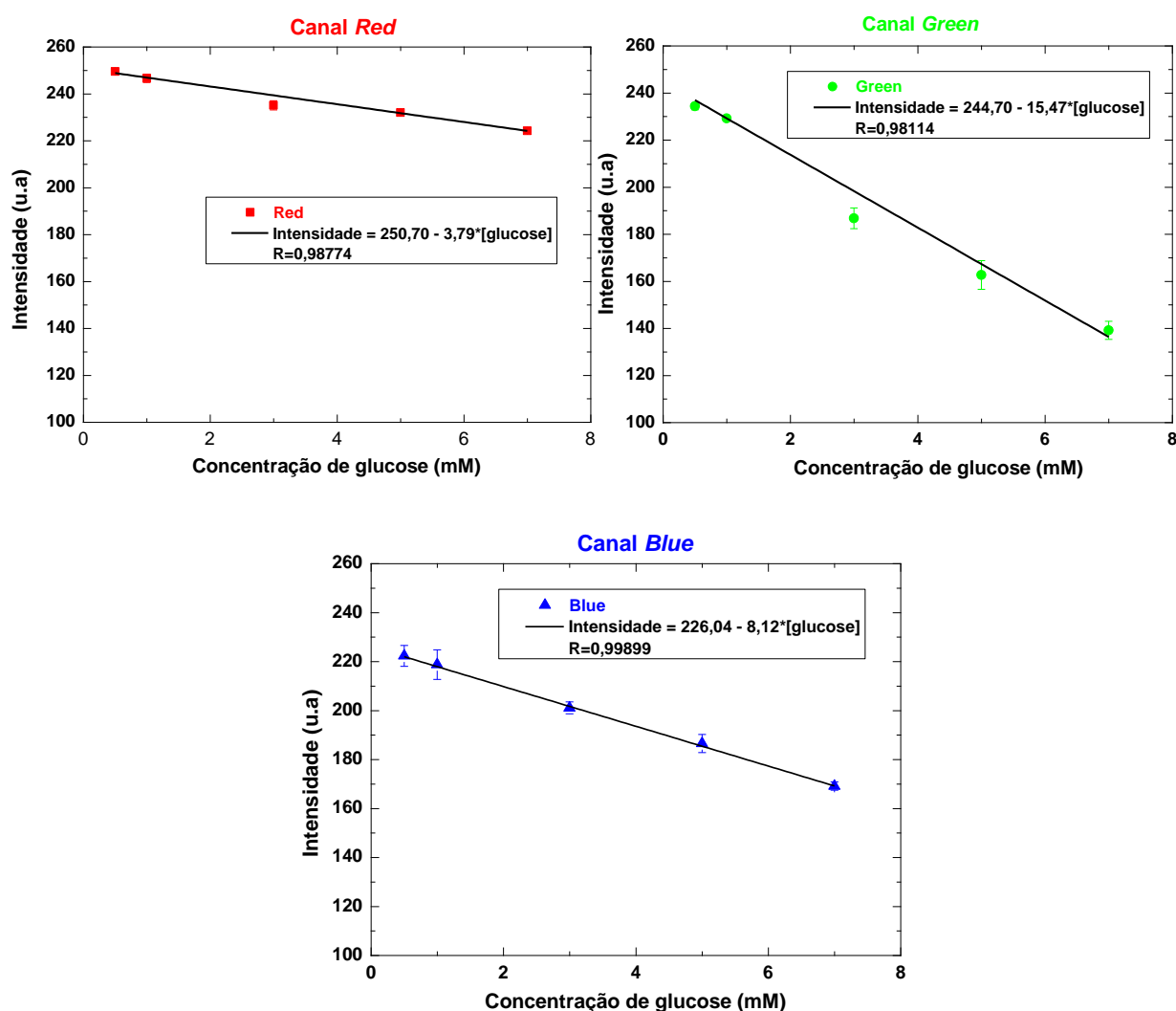


Figura 4.22 - Rectas de calibração relativas ao canal vermelho, verde e azul do indicador AB.

Para o indicador AB+KI da Figura 4.21, verifica-se que à medida que a concentração de glucose aumenta, a intensidade colorimétrica vai diminuindo até aos 10 mM. A partir desta concentração, observa-se uma estabilização da intensidade. Para determinar qual dos canais RGB deste indicador

melhor permite quantificar a glucose, construíram-se as curvas de calibração da Figura 4.23. Após análise das referidas curvas, verificou-se novamente que o canal verde proporciona maior amplitude de intensidade entre as concentrações de glucose representadas. Deste modo, o canal verde foi o escolhido para quantificar a glucose no indicador AB+KI.

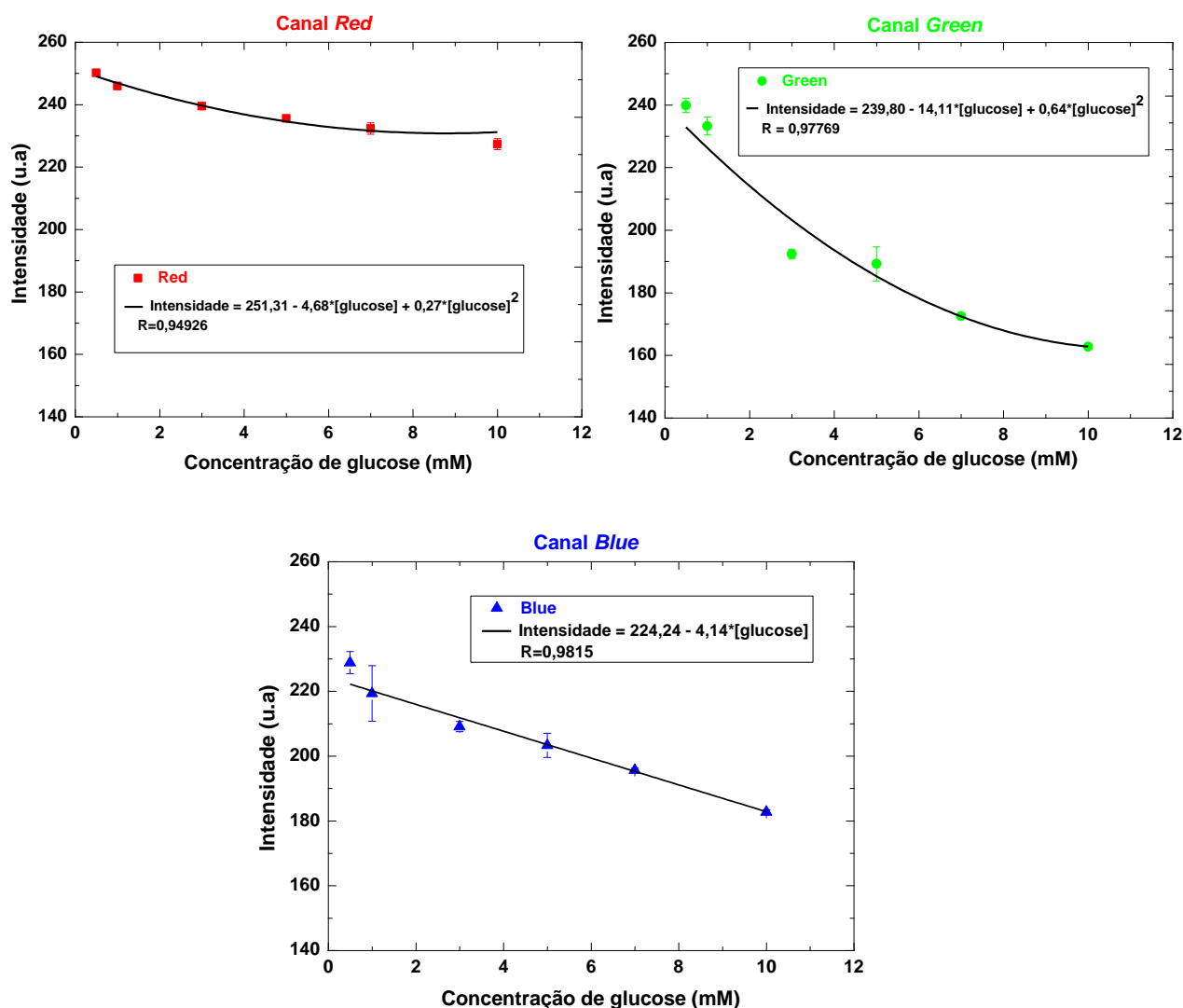


Figura 4.23 - Curvas de calibração relativas ao canal vermelho, verde e azul do indicador AB+KI

Por fim, para o indicador KI da Figura 4.21, verifica-se um aumento do intervalo de concentrações que este indicador consegue quantificar. Neste caso observou-se que o indicador KI permite determinar concentrações de glucose até aos 30 mM. A Figura 4.24 mostra as curvas de calibração construídas para a escolha do canal que melhor permite a quantificação de glucose. De acordo com estas curvas, aquela que proporciona a maior amplitude de intensidade entre as concentrações representadas e por conseguinte uma melhor leitura de resultados é o canal azul. Deste modo, para o indicador KI, foi escolhido o canal azul para quantificar a glucose.

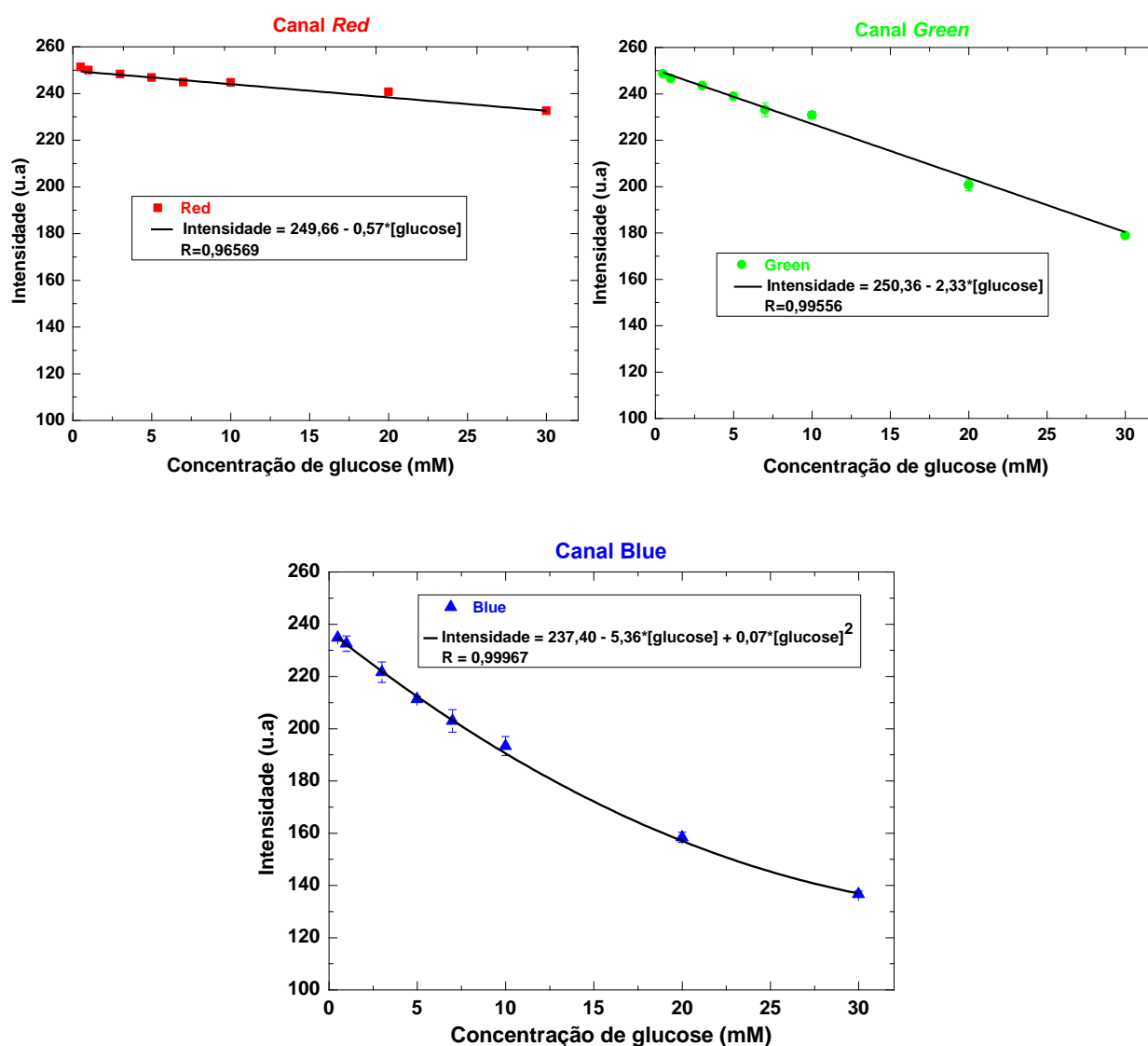


Figura 4.24 – Curvas de calibração relativas ao canal vermelho, verde e azul do indicador KI.

Para o indicador AB da Figura 4.22, foi escolhido o canal verde para quantificar as concentrações de glucose entre os 0,5 e 7,0 mM. Este canal teve um comportamento linear que se adapta a uma recta de declive -15,47, ordenada na origem 244,70 e $R^2 = 0,98114$. Para os indicadores (AB+KI) e KI, foi simulada uma curva polinomial de segundo grau entre as concentrações de 0,5 a 10,0 mM para o indicador AB+KI e 0,5 a 30,0 mM para o indicador KI. A curva polinomial for descrita pela seguinte equação: $y = a_0 + a_1 \cdot x + a_2 \cdot x^2$. Para o indicador AB+KI: $a_0 = 239,80$, $a_1 = -14,11$ e $a_2 = 0,64$ com $R^2 = 0,97769$ e para o indicador KI: $a_0 = 237,40$, $a_1 = -5,36$ e $a_2 = 0,07$ com $R^2 = 0,99967$.

O diferente comportamento de cada indicador permite uma leitura de resultados. O indicador AB mostrou-se eficaz na determinação de concentrações de glucose entre 0,5 e 7,0 mM. Este indicador pode ser útil na determinação de concentrações de glucose no sangue dentro dos níveis considerados saudáveis (entre os 4 e 7 mM) [81]. O indicador KI é o que apresenta maior amplitude de intensidade e consegue quantificar maior intervalo de concentrações abrangendo, para além dos níveis saudáveis

de concentração de glucose no sangue, níveis onde podem existir complicações relacionadas com hipoglicemia e hiperglicemia. Apesar de a curva não passar pela maioria dos pontos do gráfico do indicador AB+KI, o seu comportamento é importante para comparação com os demais indicadores.

5 Conclusões e Perspectivas Futuras

O papel, substrato fundamental para o desenvolvimento do biossensor neste trabalho, é um material de baixo custo, abundante, biodegradável. O substrato de papel usado neste trabalho foi o papel de cromatografia Whatman nº1. Este substrato é constituído essencialmente por celulose, e apresenta grande capacidade de absorção de água, tendo um ângulo de contacto médio de $13,6 \pm 1,0^\circ$. O P(3HB), material utilizado na criação de barreiras hidrófobas no papel, também é um polímero com propriedades biodegradáveis e biocompatíveis. Ao contrário do papel Whatman nº1, o filme obtido a partir de P(3HB) mostrou ter pouca afinidade com a água, apresentando um ângulo de contacto médio de $91,5 \pm 0,5^\circ$. A partir da impregnação do substrato de papel com solução de P(3HB) a 1% (m/m), num período de 8 horas, obteve-se um papel hidrófobo com um ângulo de contacto médio de $125,7 \pm 0,6^\circ$.

Diferentes técnicas de análise de materiais foram empregadas para a caracterização do papel, do P(3HB) e da conjugação destes dois materiais. A análise por DRX e FT-IR identificou, tanto no papel quanto no P(3HB), a presença de picos de difracção e bandas de absorção característicos da celulose e do P(3HB). Na análise química do papel impregnado foi identificado por FT-IR, pico que corresponde à presença do grupo funcional carbonilo ($C=O$) presente na estrutura poliéster do P(3HB) (Figura 4.19 A). As técnicas para avaliar o aumento do ângulo de contacto (WCA) permitiram concluir que os vestígios do material polimérico, visíveis pelo SEM, sobre e entre as fibras de celulose, estão directamente relacionados com a propriedade hidrófoba do papel. As análises térmicas mostraram que a degradação por efeito do aumento da temperatura, inicia-se no intervalo de 320-380 °C no papel Whatman nº1 e 257-304 °C no filme de P(3HB). Portanto, estes dois materiais não sofrem transformações no caso de serem armazenados, transportados ou utilizados na fabricação de dispositivos a temperaturas inferiores aos referidos anteriormente.

Neste trabalho, a degradação do polímero P(3HB) para a criação de canais e zonas de testes, pelos quais as soluções de glucose fluem e onde ocorrem a imobilização dos reagentes bem como a reacção com o analito, foi alcançado com exposição à radiação UV e ozono. As alterações que ocorrem num material polimérico em consequência da sua degradação podem ser classificadas em alterações químicas e físicas. Em relação à alteração química, observou-se por FT-IR que após 120 minutos de tratamento com UV-O₃ o pico que caracteriza o grupo funcional carbonilo havia decrescido significativamente na amostra PWP120 (Figura 4.19 C) e no filme P(3HB) (Figura 4.12). O peso molecular médio de P(3HB), que corresponde à propriedade física, após 120 minutos tinha diminuído cerca de 20 vezes do seu valor inicial (64 030 g/mol). Estas alterações, juntamente com a medição do ângulo de contacto em função do tempo de exposição à radiação UV e ozono (Tabela 4.2), ajudaram na escolha desse tempo de tratamento (120 minutos) para a criação de contraste hidrófilo-hidrófobo no papel.

Em suma, este trabalho permitiu utilizar e interagir com diversas técnicas de caracterização de materiais. Estudaram-se, de modo particular, as propriedades e características dos substratos de papel e do polímero P(3HB) tornando possível o desenvolvimento de um biossensor que quantificasse a glucose em soluções aquosas com algumas limitações específicas. O mecanismo ideal da detecção colorimétrica passava pela selecção de uma área, pois facilitava a automatização da análise. Houve porém necessidade de seleccionar manualmente duas áreas em cada zona de testes para obter as intensidades dos canais RGB que descrevessem o comportamento dos indicadores em função da concentração de glucose.

Este trabalho pode ainda ser optimizado no sentido de ir ao encontro daquilo que foi referido no enquadramento desta tese que é colocar à disposição dos países em vias de desenvolvimento - onde os recursos materiais e humanos são ainda escassos e poucos especializados - biossensores de papel baratos, simples de executar e biodegradáveis.

Desde modo, seguem-se algumas sugestões para estudos futuros:

- Optimizar a coloração nas zonas de detecção com fabricação de biossensores 3D;
- Optimização da resistência das barreiras hidrófobas para melhor confinar os reagentes e o analito;
- Estudo do tempo de validade dos dispositivos;
- Estudo da temperatura ideal de armazenamento dos dispositivos;

Bibliografia

- [1] M. N. Costa, B. Veigas, J. M. Jacob, D. S. Santos, J. Gomes, P. V Baptista, R. Martins, J. Inácio, and E. Fortunato, "A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper.," *Nanotechnology*, vol. 25, no. 9, p. 094006, Mar. 2014.
- [2] X. Li, D. R. Ballerini, and W. Shen, "A perspective on paper-based microfluidics: Current status and future trends.," *Biomicrofluidics*, vol. 6, no. 1, pp. 11301–1130113, Mar. 2012.
- [3] P. Lisowski and P. K. Zarzycki, "Microfluidic Paper-Based Analytical Devices (μ PADs) and Micro Total Analysis Systems (μ TAS): Development, Applications and Future Trends.," *Chromatographia*, vol. 76, pp. 1201–1214, Jan. 2013.
- [4] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, and G. M. Whitesides, "Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays.," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 46, no. 8, pp. 1318–20, Jan. 2007.
- [5] A. W. Martinez, S. T. Phillips, and G. M. Whitesides, "Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 50, pp. 19606–11, Dec. 2008.
- [6] D. A. Bruzewicz, M. Reches, and G. M. Whitesides, "Low-cost printing of poly(dimethylsiloxane) barriers to define microchannels in paper.," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 9, pp. 3387–92, May 2008.
- [7] J. Olkkonen, K. Lehtinen, and T. Erho, "Flexographically printed fluidic structures in paper.," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 24, pp. 10246–50, Dec. 2010.
- [8] K. Abe, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-printed microfluidic multianalyte chemical sensing paper.," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 18, pp. 6928–34, Sep. 2008.
- [9] K. Abe, K. Kotera, K. Suzuki, and D. Citterio, "Inkjet-printed paperfluidic immuno-chemical sensing device.," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 2, pp. 885–93, Sep. 2010.
- [10] X. Li, J. Tian, T. Nguyen, and W. Shen, "Paper-Based Microfluidic Devices by Plasma," vol. 80, no. 2008903553, pp. 9131–9134, 2008.
- [11] W. Wang, W.-Y. Wu, and J.-J. Zhu, "Tree-shaped paper strip for semiquantitative colorimetric detection of protein with self-calibration.," *J. Chromatogr. A*, vol. 1217, no. 24, pp. 3896–9, Jun. 2010.
- [12] Y. Lu, W. Shi, L. Jiang, J. Qin, and B. Lin, "Rapid prototyping of paper-based microfluidics with wax for low-cost, portable bioassay.," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 9, pp. 1497–500, May 2009.
- [13] E. Carrilho, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics.," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 16, pp. 7091–5, Aug. 2009.
- [14] B. Veigas, J. M. Jacob, M. N. Costa, D. S. Santos, M. Viveiros, J. Inácio, R. Martins, P. Barquinha, E. Fortunato, and P. V. Baptista, "Gold on paper-paper platform for Au-nanoprobe TB detection.," *Lab Chip*, vol. 12, no. 22, pp. 4802–8, Nov. 2012.
- [15] X. Li, J. Tian, G. Garnier, and W. Shen, "Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 76, no. 2, pp. 564–70, Apr. 2010.

- [16] J. L. Delaney, C. F. Hogan, J. Tian, and W. Shen, "Electrogenerated chemiluminescence detection in paper-based microfluidic sensors.," *Anal. Chem.*, vol. 83, no. 4, pp. 1300–6, Feb. 2011.
- [17] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "A low-cost, simple, and rapid fabrication method for paper-based microfluidics using wax screen-printing.," *Analyst*, vol. 136, no. 1, pp. 77–82, Jan. 2011.
- [18] G. Chitnis, Z. Ding, C.-L. Chang, C. a Savran, and B. Ziaie, "Laser-treated hydrophobic paper: an inexpensive microfluidic platform.," *Lab Chip*, vol. 11, no. 6, pp. 1161–5, Mar. 2011.
- [19] M. P. Sousa and J. F. Mano, "Superhydrophobic paper in the development of disposable labware and lab-on-paper devices.," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 5, no. 9, pp. 3731–7, May 2013.
- [20] C. G. Obeso, M. P. Sousa, W. Song, M. A. Rodriguez-Pérez, B. Bhushan, and J. F. Mano, "Modification of paper using polyhydroxybutyrate to obtain biomimetic superhydrophobic substrates," *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, vol. 416, pp. 51–55, Jan. 2013.
- [21] J. C. Roberts, *Chemistry of Paper*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 1996.
- [22] P. Fardim, "Paper and Surface Chemistry - Fiber Surface and Wet End Chemistry. Instituto química, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.," pp. 1–14.
- [23] "O papel." [Online]. Available: http://sigarra.up.pt/up/pt/web_base.gera_pagina?P_pagina=2316. [Accessed: 06-Mar-2014].
- [24] "The Plant Cell is Special." [Online]. Available: http://www.bio.miami.edu/dana/226/226F07_3.html. [Accessed: 26-Sep-2014].
- [25] "Hemicellulose Structure." [Online]. Available: <http://en.wikipedia.org/wiki/File:Hemicellulose.png>. [Accessed: 26-Sep-2014].
- [26] "Lignin Structure." [Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/File:Lignin_structure.svg. [Accessed: 26-Sep-2014].
- [27] D. Kelmm, H.-P. Schumauder, and T. Heinze, "Cellulose," *Biopolym. Online, WILEY*, pp. 275–287, 2005.
- [28] R. Pelton, "Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics," *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 28, no. 8, pp. 925–942, Sep. 2009.
- [29] E. a Dawes, "Polyhydroxybutyrate: an intriguing biopolymer.," *Biosci. Rep.*, vol. 8, no. 6, pp. 537–47, Dec. 1988.
- [30] M. Koller, A. Salerno, and M. Dias, "Modern biotechnological polymer synthesis: a review," *Food Technol. ...*, 2010.
- [31] R. A. Verlinden, D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams, Z. Piotrowska-Seget, and I. K. Radecka, "Production of polyhydroxyalkanoates from waste frying oil by *Cupriavidus necator*.,," *AMB Express*, vol. 1, no. 1, p. 11, Jan. 2011.
- [32] M. V Cruz, A. Paiva, P. Lisboa, F. Freitas, V. D. Alves, P. Simões, S. Barreiros, and M. A. M. Reis, "Production of polyhydroxyalkanoates from spent coffee grounds oil obtained by supercritical fluid extraction technology.," *Bioresour. Technol.*, vol. 157, pp. 360–3, Apr. 2014.

- [33] G. M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics.," *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–73, Jul. 2006.
- [34] H. Bruus, "Theoretical microfluidics," 2006.
- [35] M. M. V. M. Vasconcelos, "Hidráulica Geral," 2004.
- [36] V. Slapar, *Microfluidics*, no. January. University of Ljubljana, Faculty of Mathematics and Physics, Department of Physics, 2008.
- [37] Y. Zhu and K. Petkovic-Duran, "Capillary flow in microchannels," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 8, no. 2, pp. 275–282, Nov. 2009.
- [38] J. I. Ries De Corcuera and R. P. Cavalieri, *Biosensors*. Washington: Washington State University, pulman, U.S.A, 2003.
- [39] C. Parolo and A. Merkoçi, "Paper-based nanobiosensors for diagnostics.," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 42, no. 2, pp. 450–7, Jan. 2013.
- [40] X. Li, J. Tian, G. Garnier, and W. Shen, "Fabrication of paper-based microfluidic sensors by printing.," *Colloids Surf. B. Biointerfaces*, vol. 76, no. 2, pp. 564–70, Apr. 2010.
- [41] M. Santhiago, E. W. Nery, G. P. Santos, and L. T. Kubota, "Microfluidic paper-based devices for bioanalytical applications.," *Bioanalysis*, vol. 6, no. 1, pp. 89–106, Jan. 2014.
- [42] A. K. Yetisen, M. S. Akram, and C. R. Lowe, "Paper-based microfluidic point-of-care diagnostic devices.," *Lab Chip*, vol. 13, no. 12, pp. 2210–51, Jun. 2013.
- [43] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Electrochemical detection for paper-based microfluidics.," *Anal. Chem.*, vol. 81, no. 14, pp. 5821–6, Jul. 2009.
- [44] Word Health Organization, "Diabetes." [Online]. Available: <http://www.who.int/diabetes/en/>. [Accessed: 17-Mar-2015].
- [45] W. Dungchai, O. Chailapakul, and C. S. Henry, "Use of multiple colorimetric indicators for paper-based microfluidic devices.," *Anal. Chim. Acta*, vol. 674, no. 2, pp. 227–33, Aug. 2010.
- [46] M. Costa, "Desenvolvimento de microfluídica em papel para utilização em biossensores," FCT/UNL, 2012.
- [47] K. D. Vernon-Parry, "Scanning electron microscopy: an introduction," *III-Vs Rev.*, vol. 13, no. 4, pp. 40–44, Jul. 2000.
- [48] "Brief introduction to scanning electron microscopy (SEM)." [Online]. Available: <http://micron.ucr.edu/public/manuals/Sem-intro.pdf>. [Accessed: 06-Oct-2014].
- [49] G. Lamour, A. Hamraoui, A. Buvailo, Y. Xing, S. Keuleyan, V. Prakash, A. Eftekhari-Bafrooei, and E. Borguet, "Contact Angle Measurements Using a Simplified Experimental Setup," *J. Chem. Educ.*, vol. 87, no. 12, pp. 1403–1407, Dec. 2010.
- [50] D. I. Bower and W. F. Maddams, *The Vibrational Spectroscopy of Polymers*. Cambridge: Cambridge University Press, 1992.
- [51] PerkinElmer, "FT-IR Spectroscopy: Attenuated Total Reflectance (ATR). Technical Note," 2005. [Online]. Available: www.perkinelmer.com. [Accessed: 20-Sep-2014].

- [52] T. Hatakeyama and F. X. Quinn, *Thermal analysis: fundamentals and applications to polymer science*, Second Edi. England: Chichester West Sussex, 1999.
- [53] "Calorimetria diferencial de varrimento - DSC." [Online]. Available: <http://www.dq.fct.unl.pt/sites/www.dq.fct.unl.pt/files/documentos/DocLabAnalPort/Livro LA Port.pdf>. [Accessed: 26-Oct-2014].
- [54] Y. V. Tertyshnaya and L. S. Shibryaeva, "Degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and its blends during treatment with UV light and water," *Polym. Sci. Ser. B*, vol. 55, no. 3–4, pp. 164–168, Apr. 2013.
- [55] MANCHEREY-NAGEL, "Filtration." [Online]. Available: ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Filtration/FI_FiltrationEN.pdf. [Accessed: 19-Nov-2014].
- [56] J. R. Vig, "UV/ozone cleaning of surfaces," *J. Vac. Sci. Technol. A Vacuum, Surfaces, Film.*, vol. 3, no. 3, p. 1027, May 1985.
- [57] "UV-Ozone Cleaner - Novascan PSD-UV." [Online]. Available: <http://www.cenimat.fct.unl.pt/services/laboratory-electronic-and-optoelectronic-materials-and-devices/uv-ozone-cleaner-novascan-psd-uv>. [Accessed: 29-Jan-2015].
- [58] V. Tserki, N. E. Zafeiropoulos, F. Simon, and C. Panayiotou, "A study of the effect of acetylation and propionylation surface treatments on natural fibres," *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.*, vol. 36, no. 8, pp. 1110–1118, Aug. 2005.
- [59] P. H. F. Pereira, H. C. J. Voorwald, M. O. H. Cioffi, and M. L. C. P. da S. Pereira, "Preparação e caracterização de materiais híbridos celulose/NbOPO₄.nH₂O a partir de celulose branqueada de bagaço de cana-de-açúcar," *Polímeros*, vol. 22, no. 1, pp. 88–95, 2012.
- [60] S. Park, J. Baker, and M. Himmel, "Research cellulose crystallinity index: measurement techniques and their impact on interpreting cellulase performance," *Biotechnol. ...*, 2010.
- [61] J. Pang, X. Liu, X. Zhang, Y. Wu, and R. Sun, "Fabrication of Cellulose Film with Enhanced Mechanical Properties in Ionic Liquid 1-Allyl-3-methylimidazolium Chloride (AmimCl)," *Materials (Basel)*, 2013.
- [62] N. Terinte, R. Ibbett, and K. Schuster, "Overview on native cellulose and microcrystalline cellulose I structure studied by X-ray diffraction (WAXD): Comparison between measurement techniques," *Lenzinger Berichte*, 2011.
- [63] M. Jonoobi, A. P. Matehew, M. M. Abdi, K. Oksman, and M. D. Makinejad, "A comparison of modified and unmodified cellulose nanofiber reinforced polylactic acid (PLA) prepared by twin screw extrusion," *Journal Polym. Environ.*, vol. 20, no. No.4, pp. 991–997, 2012.
- [64] Z. Nie, C. Nijhuis, J. Gong, and X. Chen, "Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices," *Lab Chip*, 2010.
- [65] A. W. Martinez, S. T. Phillips, G. M. Whitesides, and E. Carrilho, "Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices.," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 1, pp. 3–10, Jan. 2010.
- [66] A. W. Martinez, S. T. Phillips, E. Carrilho, S. W. Thomas, H. Sindi, and G. M. Whitesides, "Simple telemedicine for developing regions: camera phones and paper-based microfluidic devices for real-time, off-site diagnosis.," *Anal. Chem.*, vol. 80, no. 10, pp. 3699–707, May 2008.

- [67] A. Apilux, W. Dungchai, W. Siangproh, N. Praphairaksit, C. S. Henry, and O. Chailapakul, "Lab-on-paper with dual electrochemical/colorimetric detection for simultaneous determination of gold and iron.," *Anal. Chem.*, vol. 82, no. 5, pp. 1727–32, Mar. 2010.
- [68] A. W. Martinez, S. T. Phillips, Z. Nie, C.-M. Cheng, E. Carrilho, B. J. Wiley, and G. M. Whitesides, "Programmable diagnostic devices made from paper and tape.," *Lab Chip*, vol. 10, no. 19, pp. 2499–504, Oct. 2010.
- [69] M. Garcia, "Desenvolvimento de um processo de extração de poli (3-hidroxibutirato) produzido por *Cupriavidus necator* e seu efeito sobre as características do polímero," UFSC, 2006.
- [70] S. Catoni, "Biossíntese e obtenção de PHB e PHBV plastificados com PEG visando aplicação em liberação controlada de fármacos," Universidade da região de Joinville-Univille, 2011.
- [71] I. P. Dobrovol'skaya, N. L. Kuz'mina, B. L. Biber, I. M. Stark, and Z. Y. Chereiskii, "Supramolecular structure of films based on poly-3-hydroxybutyrate," *Fibre Chem.*, vol. 24, no. 5, pp. 357–359, 1993.
- [72] X. Zhang, C. Wei, Q. He, and Y. Ren, "Preparation and characterization of biomimetic adsorbent from poly-3-hydroxybutyrate.," *J. Environ. Sci. (China)*, vol. 22, no. 8, pp. 1267–72, Jan. 2010.
- [73] R. Sindhu, B. Ammu, P. Binod, S. K. Deepthi, K. B. Ramachandran, C. R. Soccol, and A. Pandey, "Production and characterization of poly-3-hydroxybutyrate from crude glycerol by *Bacillus sphaericus* NII 0838 and improving its thermal properties by blending with other polymers," 2011.
- [74] J. Choi, J. Lee, Y. You, and W. Park, "Epoxidized polybutadiene as a thermal stabilizer for poly (3-hydroxybutyrate). II. Thermal stabilization of poly (3-hydroxybutyrate) by epoxidized polybutadiene," *Fibers Polym.*, 2003.
- [75] L. Martino, M. V Cruz, A. Scoma, F. Freitas, L. Bertin, M. Scandola, and M. A. M. Reis, "Recovery of amorphous polyhydroxybutyrate granules from *Cupriavidus necator* cells grown on used cooking oil.," *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 71, pp. 117–23, Nov. 2014.
- [76] M. L. C. Machado, "Estudos das propriedades mecânicas e térmicas do polímero biodegradável poli-3-hidroxibutirato (PHB) e de compósitos PHB/Pó de madeira," São Paulo, 2008.
- [77] M. L. C. Machado, N. C. Pereira, L. F. De Miranda, and M. C. Terence, "Estudo das Propriedades Mecânicas e Térmicas do Polímero Poli-3-Hidroxibutirato (PHB) e de Compósitos PHB / Pó de Madeira Study of Mechanical and Thermal Properties of the Polymer Poly-3-Hydroxybutyrate," vol. 20, pp. 65–71, 2010.
- [78] A. Bhuwal, G. Singh, N. Aggarwal, V. Goyal, and A. Yadav, "Poly- β -hydroxybutyrate production and management of cardboard industry effluent by new *Bacillus* sp. NA10," *Bioresour. Bioprocess.*, vol. 1, no. 1, p. 9, Jul. 2014.
- [79] F. Kessler and L. Marconatto, "Biodegradation improvement by entomopathogenic fungi of poly-(3-hydroxy-butyrato) films modified with UV-assisted surface functionalization," *Congr. Bras. Polímeros (12. 2013 set22-26 Florianópolis, SC)*, 2013.
- [80] "Who-Diabetes." [Online]. Available: http://www.who.int/diabetes/action_online/basics/en/index1.html. [Accessed: 13-Feb-2015].

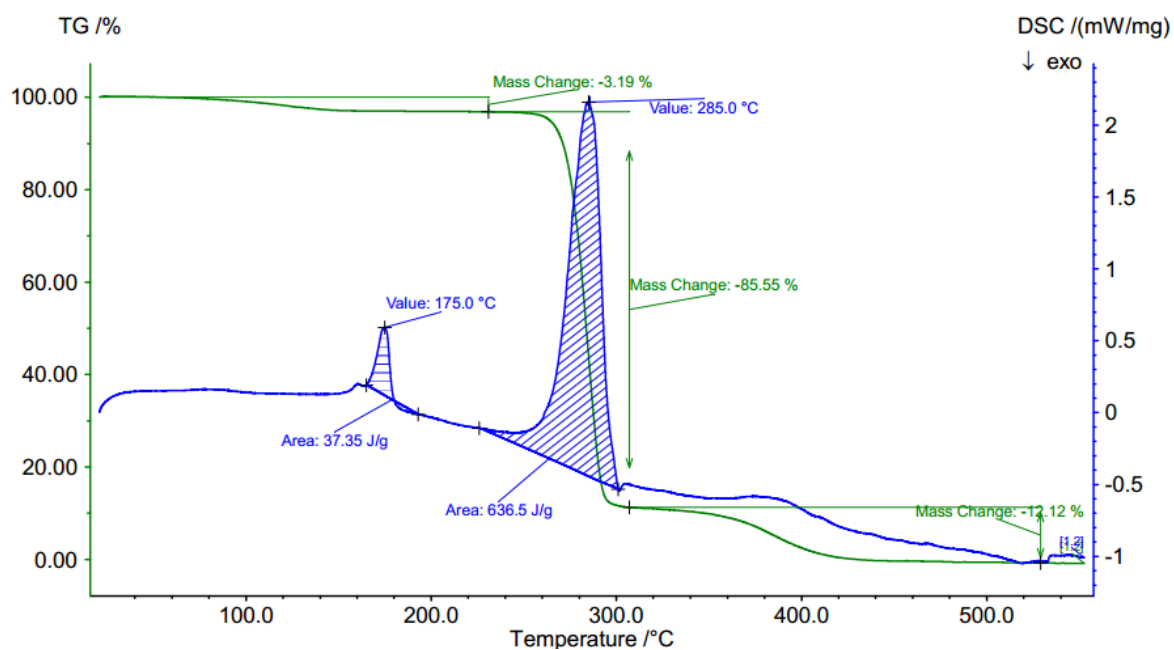
- [81] National Institutes of health, "Bood Sugar Test," *National Library of Medicine*. [Online]. Available: <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/ency/article/003482.htm>. [Accessed: 23-Feb-2015].

Anexos

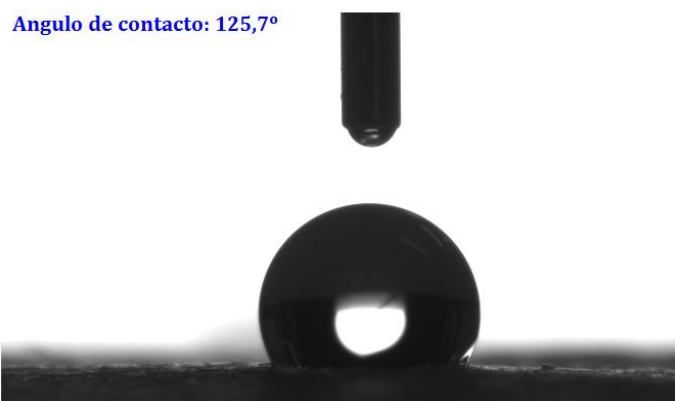
Anexo I: Tabela referente à análise termogravimétrica do filme P(3HB).

Amostra: Filme P(3HB) 1% (m/m)	ΔMassa (%)
30' UV-O₃	1^a) 2,87 2^a) 89,08 3^a) 10,11
60' UV-O₃	1^a) 4,32 2^a) 88,29 3^a) 8,90
90' UV-O₃	1^a) 4,62 2^a) 87,03 3^a) 9,28
120' UV-O₃	1^a) 3,75 2^a) 85,93 3^a) 9,21
240' UV-O₃	1^a) 5,57 2^a) 70,40 3^a) 19,92
360' UV-O₃	1^a) 4,61 2^a) 67,42 3^a) 24,15

Anexo I.1: Curvas de TG e DSC do filme P(3HB) sem tratamento com UV-O₃ feitas com o software utilizado em análises térmicas.

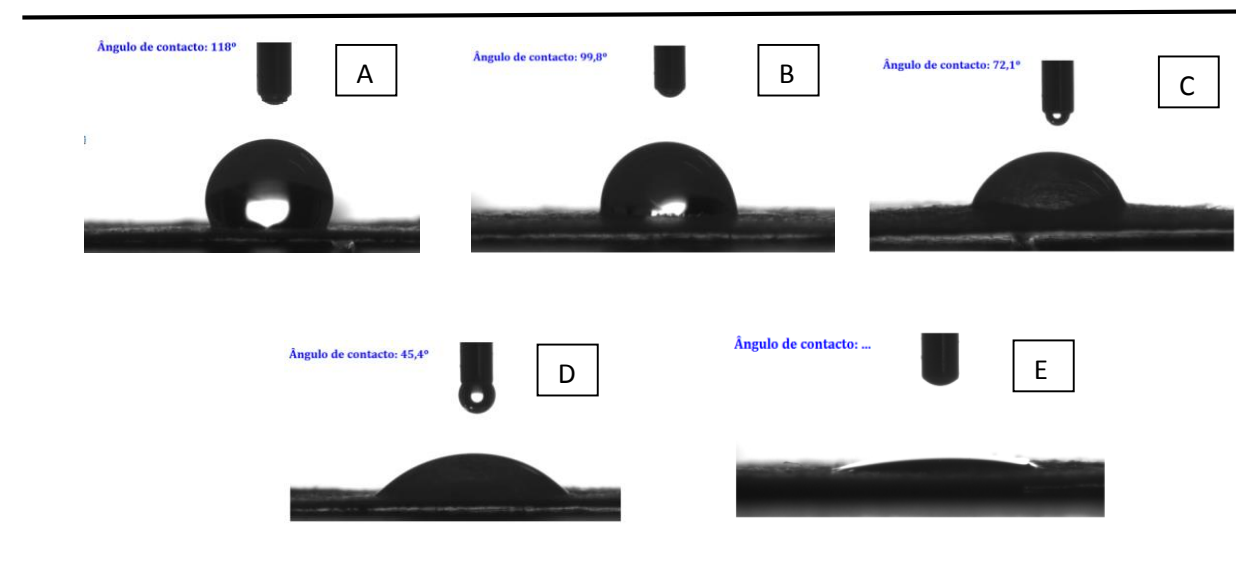


Anexo II - Ângulo de contacto médio da amostra de Whatman nº1 impregnada com 1% (m/m) de P(3HB) durante 8 horas. O ângulo de contacto medido para a amostra PWPST foi 125,7°.



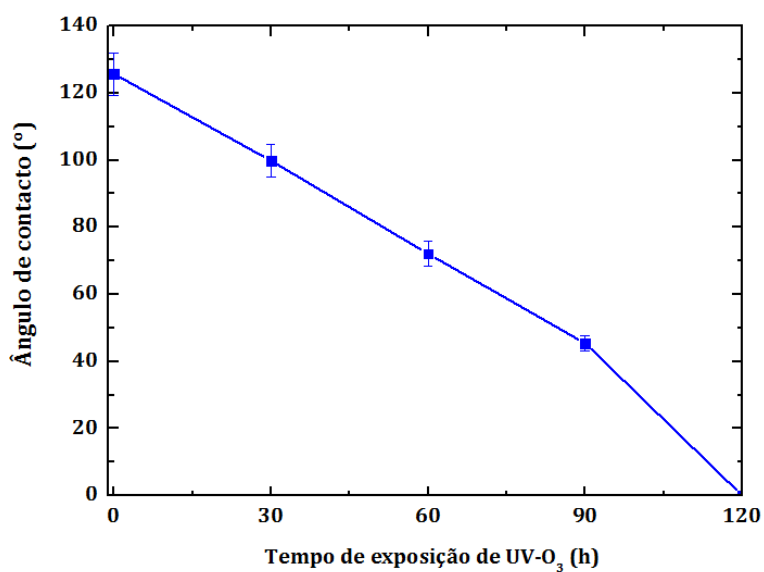
- Ângulo de contacto médio da amostra PWPST.

Anexo II.1- Ângulo de contacto das amostras tratadas com UV-O₃ com 15,30,60, 90 e 120 minutos.

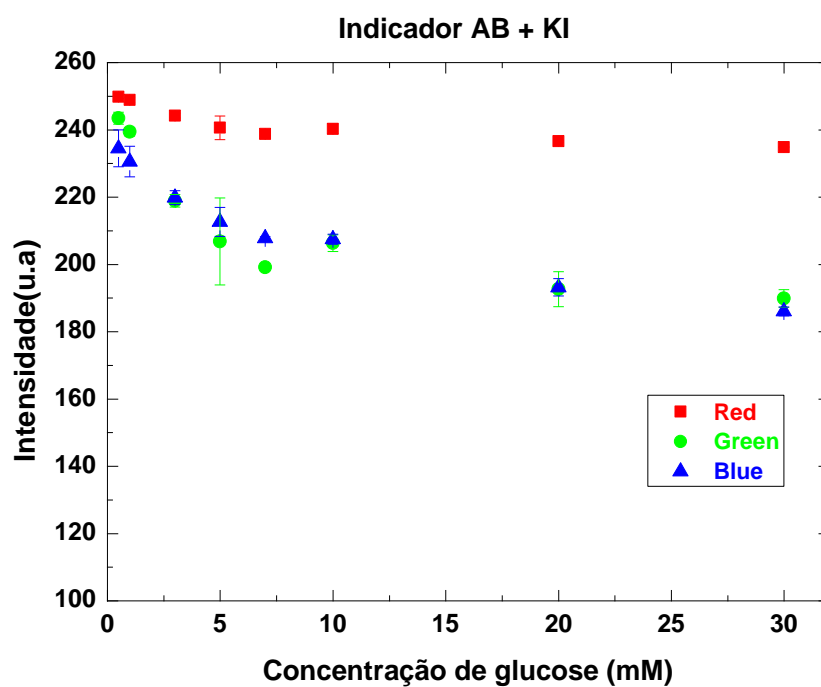
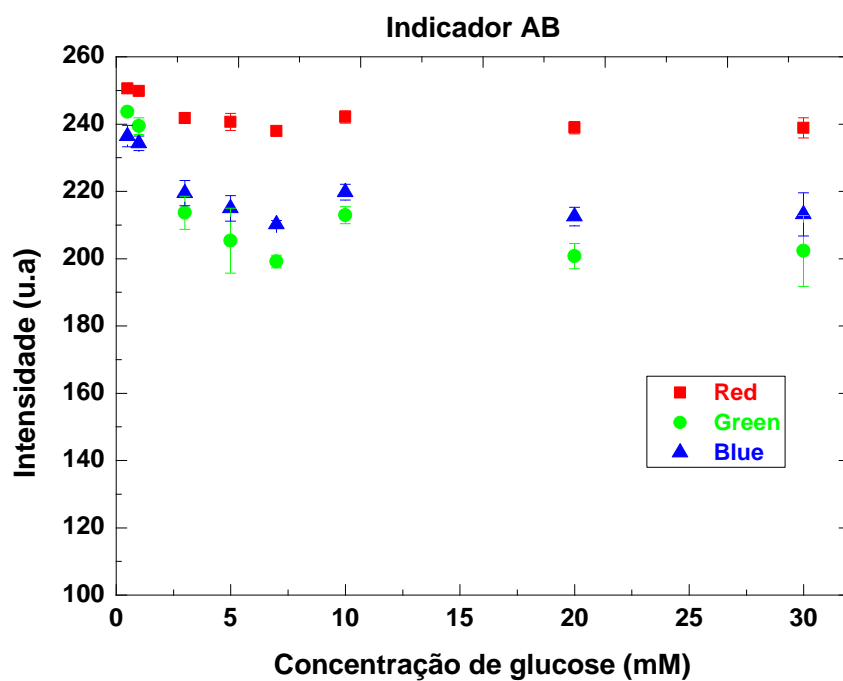


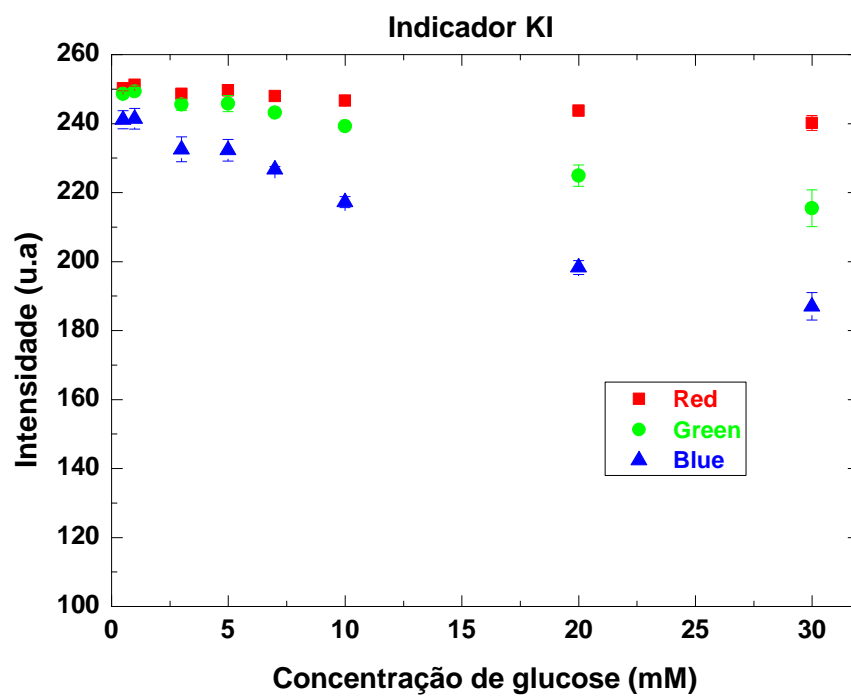
Tempo de tratamento com UV-O₃: A) 15 minutos de UV-O₃; B) 30 minutos de UV-O₃; C) 60 minutos de UV-O₃; D) 90 minutos de UV-O₃ e E) 120 minutos de UV-O₃.

Anexo II.2- Representação gráfica do tempo de tratamento com UV-O₃ em função do ângulo do contacto.



Anexo III: Gráficos de quantificação de glucose através da análise RGB obtidos com a seleção de uma área.





Anexo IV: Imagens de SEM de Papel Whatman nº1 impregnado com P(3HB) e submetido ao tratamento com UV-O₃ de 360 minutos.

